



Università di Pisa

Facoltà di Medicina Veterinaria

Corso di Laurea Magistrale in Medicina Veterinaria

Anno Accademico 2005–2006

Tesi di Laurea

**Analisi retrospettiva pluriennale di
casi di linfoma maligno nel cane.
Principali osservazioni di carattere
clinico e di laboratorio**

Candidato:

Elisa Valori

Relatore:

Prof. George Lubas

Correlatore:

Dott.ssa Alessandra Gavazza

*Ai miei cari nonni
Oreste e Ulderico,
sempre qui nel mio cuore*

RIASSUNTO

Parole chiave: linfoma, cane, diagnosi, caratteristiche cliniche, prognosi

I tumori ematopoietici, in particolare quelli che originano dai tessuti linfatici, sono tra le neoplasie che più frequentemente interessano la specie canina. L'esame citologico di un campione ottenuto per agoinfissione linfonodale rappresenta il metodo più semplice per giungere a una diagnosi di linfoma; il ricorso, inoltre, ad un esteso pannello di analisi di laboratorio (emogramma, esame del midollo, profilo biochimico, esame delle urine, profilo coagulativo, sieroelettroforesi, radiografie toraciche ed ecografie addominali, esami parassitologici ed eventualmente immunofenotipizzazione) consente al clinico di emettere un corretto giudizio prognostico e impostare un adeguato protocollo terapeutico. In questo studio sono stati valutati 120 cani affetti da linfoma osservati nel periodo 1999-2006. Tutti i soggetti sono stati inizialmente sottoposti ad un'accurata visita clinica, stadiati e quindi classificati attraverso l'esame del linfonodo; inoltre sono state valutate le eventuali alterazioni ematologiche presenti, il coinvolgimento midollare, la funzionalità epatica e renale, la funzionalità coagulativa. Per 22 linfomi è stato stabilito l'immunofenotipo. Infine in 16 soggetti è stato studiato uno specifico protocollo terapeutico, valutato l'andamento della malattia e calcolati il tasso di remissione completa, la comparsa della recidiva e il tempo di sopravvivenza.

ABSTRACT

Key words: lymphoma, dog, diagnosis, clinical features, prognosis

Haematopoietic tumors, in particular those originating from the lymphatic tissues, are among the most frequently occurring neoplasms in the dog. Cytologic evaluation of a fine-needle non-aspirated lymph node sample represents the easier way to reach a diagnosis of lymphoma. Furthermore an ancillary diagnostic work-up (including CBC, bone-marrow aspirate, serum biochemistry profile, urinalysis, coagulation profile, serum electrophoresis, thoracic radiography and abdominal ultrasonography, parasitologic exams and, if possible, immunocytochemical analysis) allows the clinician to formulate an appropriate prognostic opinion and to begin a suitable therapeutic protocol. In this work one hundred and twenty dogs with malignant lymphoma were analyzed during the period ranging from 1999 to 2006. All dogs were first evaluated by physical examination, clinically staged and then subtyped by cytologic evaluation of the lymph node; furthermore the presence of haematologic modifications, bone marrow involvement, liver and kidney function and coagulation function were evaluated. Twenty-two cases of lymphoma had their immunophenotypes established. Finally sixteen dogs were treated using a specific chemotherapeutic protocol and the course of the disease, complete response rate, time to relapse and survival time were evaluated.

Indice

PARTE GENERALE	1
Introduzione	2
1 IL LINFOMA	4
1.1 Incidenza	5
1.2 Eziologia	6
1.3 Classificazione	8
1.4 Aspetti citologici dei principali tipi di linfoma	15
1.5 Sintomi clinici	20
1.6 Alterazioni emato-biochimiche	23
1.7 Diagnosi	25
1.8 Fattori prognostici	27
1.9 Terapia	29
1.9.1 Principi di chemioterapia	30
1.9.2 Farmaci antitumorali	32
1.9.3 Tossicità della chemioterapia	34
1.9.4 Terapia del linfoma nel cane	36
PARTE SPERIMENTALE	43
Introduzione	44

2	MATERIALI E METODI	46
2.1	Emogramma	47
2.2	Profilo biochimico e analisi delle urine	49
2.3	Profilo coagulativo	49
2.4	Elettroforesi	49
2.5	Agoinfissione linfonodale	49
2.6	Agoaspirato midollare	50
2.7	Immunofenotipizzazione	51
2.8	Analisi parassitologiche	51
2.9	Analisi statistica	51
3	RISULTATI	53
3.1	Premessa	53
3.2	Segnalamento	54
3.3	Classificazione	57
3.4	Sintomi clinici	59
3.4.1	Anamnesi	59
3.4.2	Esame clinico	61
3.5	Emogramma	64
3.6	Esame del midollo osseo	68
3.7	Profilo biochimico ed esame delle urine	72
3.8	Profilo coagulativo	76
3.9	Elettroforesi delle sieroproteine	77
3.10	Sierologia	77
3.11	Follow up	79
3.11.1	Gruppo 1.	82
3.11.2	Gruppo 2.	84
3.11.3	Gruppo 3.	86
3.11.4	Gruppo 4.	92
3.11.5	Statistica inferenziale	97

4	DISCUSSIONE	103
5	CONCLUSIONI	110
	Bibliografia	111
	Ringraziamenti	121

PARTE GENERALE

INTRODUZIONE

Il linfoma (o linfosarcoma¹) è una neoplasia linfoide maligna derivante da una proliferazione clonale di linfociti maligni in tessuti solidi (linfonodi, milza, fegato, ecc...) e costituisce il disordine ematologico tumorale più segnalato nel cane. Presenta molte analogie con il gruppo dei NHL (Non Hodgkin's Lymphomas)² dell'uomo ed anche per questo è stato ampiamente studiato. Rappresenta una patologia molto preoccupante, sia per la sua frequenza che per la gravità e l'aggressività: basti tener conto del fatto che i cani con linfoma non sottoposti a trattamento farmacologico hanno una sopravvivenza mediana di circa 2 mesi.

Questa tesi consiste in uno studio retrospettivo di una popolazione eterogenea di 120 cani, residenti prevalentemente in Toscana, in cui è stato diagnosticato un linfoma negli anni tra il 1999 e il 2006 presso il laboratorio di Ematologia Veterinaria del Dipartimento di Clinica Veterinaria dell'Università di Pisa. Tutti i soggetti sono stati tipizzati dal punto di vista citologico attraverso l'esame del linfonodo e stadiati dal punto di vista clinico attraverso un'accurata visita clinica e l'esecuzione di un completo pan-

¹Termine ormai in disuso.

²La sigla NHL nell'uomo sta ad indicare tutti i processi neoplastici di origine linfocitaria con esclusione della Hodgkin's Disease: questa neoplasia linfoide istologicamente è caratterizzata dalla presenza di cellule giganti binucleate o polinucleate, cosiddette *di Reed-Steinberg* associate generalmente ad una componente cellulare reattiva (linfocitaria, istiocitaria, plasmocitaria, granulocitaria eosinofila e neutrofila) congiunta a iperplasia fibrillare evolvente verso la fibrosi. Nel cane i linfomi tipo Hodgkin sono assai rari.

nello d'analisi comprendente emogramma, esame del midollo osseo, profilo biochimico, esame delle urine, profilo coagulativo, sieroelettroforesi e, dove possibile, immunofenotipizzazione. Tutti questi esami, non essenziali per la formulazione della diagnosi di linfoma, sono invece estremamente utili per l'inquadramento del soggetto in termini clinici, per la stadiazione della malattia e per l'emissione di un giudizio in termini prognostici. Dove possibile è stato impostato uno specifico protocollo terapeutico, valutato l'andamento della malattia e calcolato il tempo di sopravvivenza in funzione del trattamento. Scopo di questa tesi è mettere in evidenza le principali caratteristiche cliniche e alterazioni di laboratorio riscontrate in corso di linfoma canino, valutarne l'importanza ai fini prognostici e verificarne la corrispondenza con quanto riportato in letteratura.

Capitolo 1

IL LINFOMA

Il termine linfoma indica un gruppo eterogeneo di neoplasie maligne dei linfociti T, B o nè T nè B, che si manifestano come masse tumorali solide originatesi dai linfonodi o da qualsiasi altro distretto dell'organismo dove è presente tessuto linfoide (milza, fegato, timo, pelle e tessuti linfoidi associati alle mucose). Tali neoplasie si propagano da un organo linfoide all'altro, oppure raggiungono anche altri organi non linfoidi. Tra i disordini neoplastici del tessuto emopoietico il linfoma rientra nel gruppo dei disordini linfoproliferativi (LPD), insieme alla leucemia linfocitica acuta e a quella cronica. La differenza tra leucemia e linfoma si basa proprio sull'origine dell'emopatia: la prima infatti origina dal midollo osseo ed invade sistematicamente il sangue periferico mentre nel linfoma l'invasione del sangue periferico avviene in conseguenza della metastasi del midollo osseo da parte delle cellule tumorali e non sempre questo si verifica. Il linfoma può quindi essere leucemico quando sono presenti in circolo cellule linfomatose, aleucemico quando non ci sono tracce di tali cellule nel sangue periferico.

1.1 Incidenza

Il linfoma è la terza neoplasia in ordine di frequenza nel cane (dopo i tumori mammari e cutanei) [61] e costituisce circa il 5–7% di tutte le neoplasie e l'85% dei tumori maligni emopoietici in questa specie. E' stato stimato che l'incidenza annuale sia compresa tra 13 e 24 su 100.000 cani a rischio [23], tuttavia l'incidenza reale del linfoma è sconosciuta e questo dato potrebbe risultare in realtà sottostimato poichè, a differenza dell'uomo, non esiste un registro ufficiale dei tumori per i cani, non tutta la popolazione canina viene costantemente monitorata a questo riguardo e anche perchè in queste statistiche rientrano solo i casi di linfoma diagnosticati con esami citologici e/o istologici.

Interessa animali di tutte le età con particolare predominanza tra 5,5 e 9,1 anni; in animali di un anno di età la frequenza è di 1,5 casi ogni 100.000 cani contro 80 casi su 100.000 in animali di dieci anni di età [24].

La predisposizione alla malattia sembra non essere legata al sesso, anche se è stato segnalato un rischio maggiore nelle femmine intere rispetto a quelle sterilizzate [61]; inoltre sembra che il linfoma gastrointestinale si sviluppi in prevalenza nei cani maschi [17].

Al contrario del precedente, la razza è sicuramente un fattore molto importante. Tra le razze più colpite troviamo il Golden Retriever, il Pastore Tedesco, il Labrador Retriever, il Cocker Spaniel, il Rottweiler e il Pastore delle Shetland [20], ma anche il Boxer, lo Scottish Terrier, il Basset Hound, l'Airedale Terrier, il Bulldog, mentre sono raramente interessati da questa patologia il Dachshund e il Volpino di Pomerania [8]. Questa osservazione fa ipotizzare un coinvolgimento di fattori genetici che potrebbero condizionare l'ereditabilità di questa malattia.

1.2 Eziologia

Il linfoma nel cane è una patologia ad eziologia multifattoriale, poiché non è stato possibile individuare un solo agente eziologico.

A differenza del gatto, nel cane non esistono prove certe di un'origine retrovirale del linfoma. Tuttavia è stato dimostrato che le cellule linfomatose canine contengono alte quantità di trascrittasi inversa [72]; sono state trovate particelle con proprietà retrovirali in cani affetti da linfoma ed è stata evidenziata un'attività di trascrittasi inversa nel soprannatante di colture cellulari di cani affetti [12]. E' stata inoltre riscontrata la presenza di particelle virali con morfologia dei retrovirus di tipo C nelle sezioni ultrasottili della linea cellulare DLC 01, ottenuta a partire da un linfonodo di un cane con Sindrome di Sézary¹ [30].

E' evidente invece il ruolo svolto dalla componente genetica, dal momento che questa forma neoplastica ha una prevalenza molto elevata in alcune linee di sangue piuttosto che in altre. Abbiamo già ricordato l'esistenza di una predisposizione di razza nei confronti della malattia; sono inoltre riportati casi di raggruppamenti di linfomi maligni all'interno degli stessi nuclei familiari [67] e questo fa ipotizzare una ereditabilità della patologia, ma è doveroso ricordare che membri della stessa famiglia sono spesso sottoposti alle stesse influenze ambientali e ai medesimi fattori infettivi.

Poiché nell'uomo sono state osservate anomalie cromosomiche in soggetti affetti da linfoma (tra cui traslocazioni mediante le quali proto-oncogeni verrebbero accoppiati con geni codificanti le immunoglobuline e di conseguenza attivati), anche nel cane è stato ipotizzato un coinvolgimento molecolare nel determinismo della malattia. In uno studio di Teske et al del 1993 [70] è stato riscontrato che la frequenza dell'aneuploidia del DNA nel linfoma maligno del cane è simile a quella osservata nel NHL dell'uomo, tuttavia non

¹La Sindrome di Sézary è una variante della *Micosi Fungoide*, linfoma T cutaneo primariamente epidermotropo.

era presente alcuna relazione tra la ploidia del DNA e l'istomorfologia e la prognosi.

Numerosi studi hanno rivelato una potenziale associazione fra autoimmunità e/o sistema immunitario e neoplasia emopoietica nel cane. E' riportato, ad esempio, che cani con trombocitopenia immunomediata presentavano una maggior occorrenza di linfoma rispetto a quelli non colpiti da tale disordine [40]. Nell'uomo è stato visto che la probabilità di manifestare un linfoma aumenta nei soggetti immunodepressi ed anche nel cane è rilevabile una soppressione della risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata in corso di linfoma [77]. Tuttavia non è ancora stato accertato se tale fenomeno rappresenti una causa o un effetto della malattia stessa; a questo proposito è interessante osservare che il grado di competenza del sistema immunitario umorale e cellulare non sembri variare in razze ad alto rischio rispetto a quelle a basso rischio [22].

Infine è stato ampiamente studiato il ruolo dei fattori ambientali sull'insorgenza della malattia, sebbene sia ancora sconosciuto il meccanismo d'azione e non sia chiaro se questi agiscano da soli o in concomitanza ad altri fattori predisponenti. In particolare è stata riferita un'associazione tra il rischio di linfoma maligno nel cane e l'esposizione agli erbicidi a base di acido 2,4-diclorofenossiacetico; l'effetto di tale sostanza sarebbe dose-dipendente e massimo in quei casi che vivono in ambienti trattati 4 o più volte l'anno [36]. Altro fattore di rischio ambientale è l'esposizione a campi elettromagnetici a bassa frequenza (50-60 Hz): il rischio aumenta in quegli animali che passano più del 25% della loro giornata fuori casa [64]. In merito a quanto detto fin'ora è interessante sottolineare come uno studio condotto presso il dipartimento di Clinica Veterinaria dell'Università di Pisa su 88 cani con linfoma ha dimostrato la presenza di una correlazione tra l'emopatia degli animali e l'uso da parte dei padroni di sostanze tossiche quali erbicidi, solventi, benzine e la residenza in zone a particolare inquinamento ambientale [29].

1.3 Classificazione

La classificazione dei linfomi è un problema da tempo dibattuto, sia in umana che in veterinaria: molteplici sono le classificazioni proposte nel tempo, basate su parametri anatomici, citologici, istopatologici e immunologici, ma nessuna di queste soddisfa a pieno ogni esigenza di studio.

La classificazione *anatomica* è forse la più conosciuta e utilizzata e suddivide il linfoma in quattro forme, in base alla localizzazione del processo neoplastico (vedi tabella 1.1).

1.	Multicentrica (84%)	linfadenomegalia generalizzata con frequente epato-splenomegalia e coinvolgimento midollare
2.	Alimentare (6.9%)	infiltrazione solitaria, diffusa o multifocale del tratto gastroenterico, in presenza o meno di linfadenopatia endoaddominale
3.	Mediastinica (<5%)	linfadenopatia mediastinica con o senza coinvolgimento del midollo osseo
4.	Extranodale	può interessare qualsiasi organo o tessuto (rene, cute, occhio, sistema nervoso centrale e periferico, cuore, ecc...)

Tabella 1.1: **Classificazione anatomica.**

Un altro tipo di classificazione è quella proposta dall'*Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO)* e dalla *Veterinary Cancer Society*, analoga a quella TNM (Tumore-Linfonodo-Metastasi) già adottata in medicina umana; questa identifica, per ogni forma anatomica, cinque stadi che permettono di differenziare il grado di evoluzione del processo patologico (vedi tabella 1.2).

Ogni stadio è subclassificato in:

- a-** senza segni sistemici;
- b-** con segni sistemici.

Occorre tener conto del fatto che raramente il proprietario riesce a rilevare

STADIO	Organi interessati
I	interessamento di un solo linfonodo o tessuto linfatico di un organo (escluso il midollo osseo)
II	interessamento di più linfonodi in una regione (+/- tonsille)
III	interessamento linfonodale generalizzato
IV	coinvolgimento di fegato e/o milza (+/- stadio III)
V	manifestazioni nel sangue e coinvolgimento del midollo osseo e/o di organi di altri apparati (+/- stadi I-IV)

Tabella 1.2: **Stadi clinici del linfoma.**

il I o II stadio del linfoma e generalmente nel momento in cui il cane viene portato dal veterinario la patologia è già al III stadio.

Passiamo ora alla classificazione citoistologica. Molte classificazioni sono state messe a punto nel tentativo di correlare i parametri cito-istologici con quelli biologici della neoplasia. La prima classificazione istologica è quella di *Rappaport* [62] che suddivide i linfomi in cinque tipi in base alle caratteristiche morfologiche delle cellule predominanti (vedi tabella 1.3). Ogni tipo

Tipo	Linfoma
1	Indifferenziato
2	Linfoblastico poco differenziato
3	Linfocitico ben differenziato
4	Misto linfocitico-istiocitico
5	Istiocitico

Tabella 1.3: **Classificazione di Rappaport.**

morfologico, in rapporto alla struttura istologica del tessuto neoplastico, può presentare varianti “nodulari o follicolari” (le cellule sono raggruppate in addensamenti pseudofollicolari più o meno netti o sfumati, privi della distinta configurazione di un centro germinativo e di un mantello, cioè della polarità caratteristica dei noduli linfatici tipici) e “diffuse” (la distribuzione delle cellule è uniforme in ogni punto). Il sistema Rappaport risulta in realtà di scarsa importanza per la classificazione del linfoma canino, poiché presenta

dei difetti evidenti², in quanto la maggior parte dei gruppi classificativi sono eterogenei dal punto di vista immunologico, questo vuol dire che tipi simili per morfologia originano da cellule diverse per funzione (T o B) e per grado di differenziazione: questo schema classificativo, quindi, anche se di facile applicazione nella pratica clinica, risulta inadeguato da un punto di vista concettuale [1] ed inoltre non fornisce utili indicazioni di valore prognostico e terapeutico [79].

E' per questo motivo che successivamente sono stati proposti nuovi schemi classificativi che tengono conto anche delle variazioni morfologiche dei linfociti normali durante la differenziazione antigenica indipendente e nelle diverse fasi dell'attivazione immunologica, e della scoperta di marker immunologici ed enzimatici specifici per le popolazioni linfocitarie B e T. Primo esempio in questo senso è lo schema proposto da *Lukes-Collins* [43], i quali hanno associato alle caratteristiche strutturali e citologiche anche quelle immunologiche: i linfomi vengono suddivisi a seconda dell'origine dei linfociti in tipo cellulare T, B, U (*Undefined Cells*: cellule non assimilabili né al gruppo cellulare T né B), istiocitico (cellule di origine mononucleato-macrofagica³) ed inclassificabile (vedi tabella 1.4).

Il principio base di questa classificazione è che i disordini linfoproliferativi rappresentano l'espansione neoplastica di un singolo clone linfocitario; è sicuramente un sistema classificativo più accurato del precedente (soprattutto per quanto riguarda l'origine cellulare), tuttavia, vista la maggiore complessità della nuova terminologia citologica, i clinici hanno spesso preferito utilizzare lo schema di Rappaport.

Una delle classificazioni più usate è senza dubbio quella di *Kiel* [42]

²Ad esempio: il *linfoma istiocitico*, che corrisponde ai tipi "a grandi cellule" delle altre classificazioni, è in realtà a genesi linfoide e non monocitico-macrofagica, quindi il termine è improprio; i *linfomi misti linfocitico-istiocitico* sono in realtà composti da cellule della stessa origine con morfologia diversa.

³Identificabili con colorazioni specifiche e per l'assenza di marker immunoistochimici caratteristici delle popolazioni linfocitarie.

I	Tipo cellulare U	
II	Tipo cellulare T	Micosi fungoide e sindrome di Sézary Linfocita convoluto Sarcoma immunoblastico a cellule T
III	Tipo cellulare B	Piccolo linfocita Linfocita plasmocitoide Linfociti del centro follicolare: piccoli clivati; grossi clivati; piccoli non clivati; grossi non clivati
IV	Tipo istiocitico	
V	Inclassificabile	

Tabella 1.4: **Classificazione di Lukes-Collins.**

che suddivide i linfomi in due importanti gruppi: quello a basso grado di malignità e quello ad elevato grado di malignità (vedi tabella 1.5).

GRADO	Linfoma
Basso	Linfocitico (Linf. B o T; micosi fungoide, s. Sézary) Linfoplasmocitico Plasmocitico Centrocitico Centroblastico-Centrocitico (follicolare e/o diffuso)
Alto	Centroblastico (puro o monomorfo ; misto o polimorfo) Linfoblastico (B, Burkitt; T, a cell. convolute; non classif.) Immunoblastico Anaplastico

Tabella 1.5: **Classificazione di Kiel.**

In seguito la classificazione di Kiel è stata aggiornata (*Updated Kiel*); essa divide il linfoma in base al fenotipo e al grado di malignità (vedi tabella 1.6).

Infine abbiamo la *Working Formulation*, una classificazione proposta dal National Cancer Institute (NCI) che suddivide anch'essa i linfomi in base al grado di malignità (vedi tabella 1.7) [56].

Questi nuovi sistemi (*Updated Kiel* e *NCI Working Formulation*), pur tenendo conto della morfologia cellulare, rispondono meglio dei precedenti all'esigenza di uno schema classificativo con validi riferimenti alla prognosi

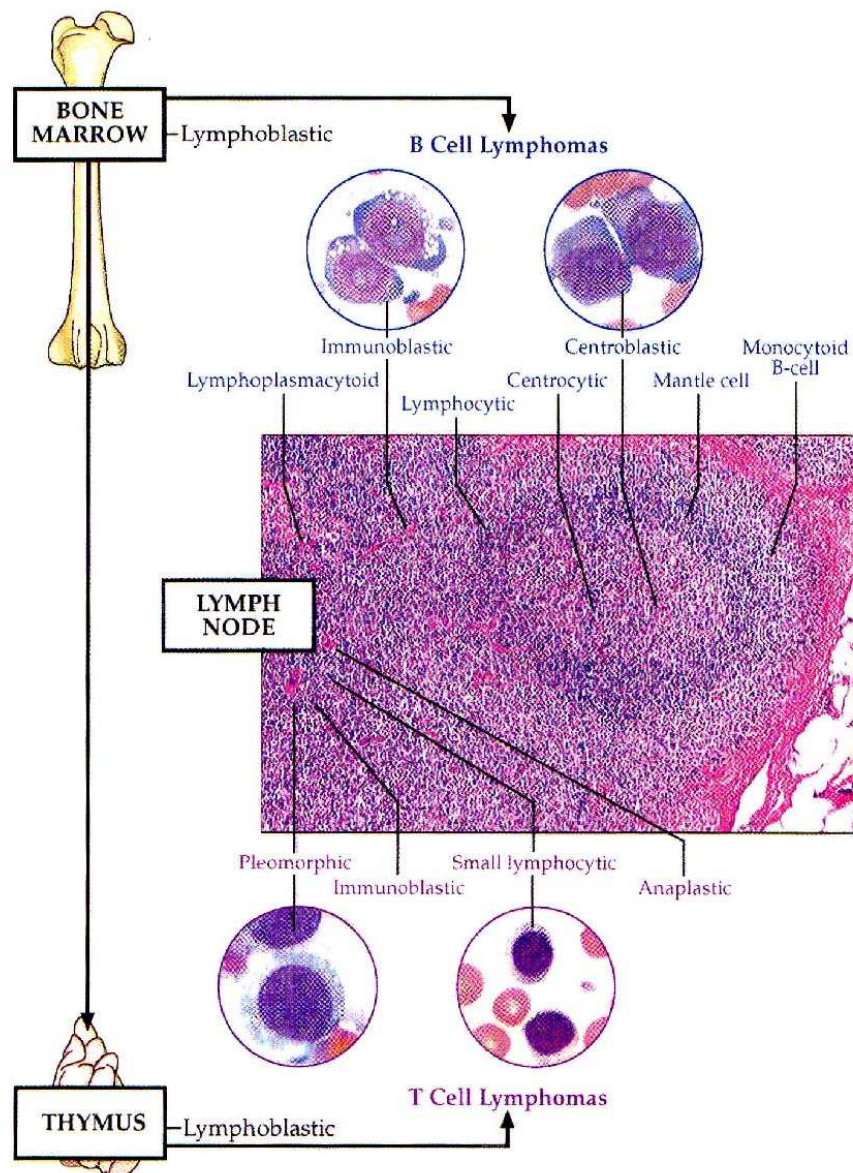


Figura 1.1: **Classificazione dei linfomi secondo lo schema di Kiel** (da Messick J.B. e Calderwood May M.B., Classification of lymphomas in *Shalm's Veterinary Hematology*, Feldman BE, Zinkl JG, Jain NC, eds. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2000).

GRADO	LINFOMA
Linfomi B	
Basso	Linfocitico Linfoplasmocitico Prolinfocitico Centrocitico Centroblastico-Centrocitico Cellule Medie Macronucleate
Alto	Centroblastico monomorfo Centroblastico polimorfo Immunoblastico Tipo Burkitt Plasmocitoide Linfoblastico
Linfomi T	
Basso	Piccole cellule chiare Prolinfocitico Pleomorfo a piccole cellule Micosi fungoide
Alto	Pleomorfo misto Pleomorfo a grandi cellule Immunoblastico Plasmocitoide Linfoblastico

Tabella 1.6: **Classificazione secondo la Kiel updated.**

e alla terapia: ai linfomi di basso grado corrisponde infatti una prognosi più favorevole per la durata della malattia, a quelli di grado più elevato una prognosi infausta. E' stato semplificato l'approccio clinico alla malattia e questo ne spiega il largo uso anche tra i clinici.

Indipendentemente dal sistema di nomenclatura istologico utilizzato, nel cane, rispetto all'uomo, si osserva che: l'architettura istologica è di regola diffusa, predominano le forme ad intermedio-alto grado di malignità ed i tipi cellulari più comuni sono il linfoma *centroblastico monomorfo* e *polimorfo* (classificazione di Kiel)⁴ e il linfoma *immunoblastico*, come riportato ad

⁴Equivalente al linfoma *diffuso a grandi cellule* nella classificazione Working Formulation.

GRADO	Linfoma	
Basso	Diffuso a piccoli linfociti	linfocitico plasmocitoide
	Follicolare a piccole cellule clivate	
	Follicolare misto	
Medio	Follicolare a grandi cellule non clivate	
	Diffuso a grandi cellule non clivate	
	Diffuso a piccole cellule clivate	
	Diffuso misto	
Alto	Immunoblastico	
	Linfoblastico	convoluto non convoluto
	Diffuso a piccole cellule non clivate	Burkitt
		non Burkitt

Tabella 1.7: **National Cancer Institute Working Formulation.**

esempio in importanti studi di statistica cito-istologica condotti sul linfoma canino da Carter&Valli, Greenlee et al., Teske et al. nel 1986, 1990 e 1994 rispettivamente [10, 31, 71].

L'identificazione della classe linfocitaria interessata dal processo neoplastico non può essere basata solo su criteri cito-morfologici (secondo i quali quasi tutti i linfomi vengono erroneamente considerati a cellule B): un metodo estremamente preciso di riconoscimento è quello della immunofenotipizzazione, basato cioè sull'utilizzo di anticorpi monoclonali specifici, grazie ai quali è possibile classificare i linfomi in base alle cellule d'origine. L'esame del fenotipo può essere realizzato sullo striscio fresco o congelato, sui blocchi in paraffina o tramite citofluorimetria. Gli anticorpi utilizzati nel cane sono quelli che riconoscono sulla superficie le molecole dei linfociti T (CD3, CD4, CD5, CD8) le molecole dei linfociti B (CD79a, CD21, le immunoglobuline di superficie e citoplasmatiche) e l'antigene di proliferazione Ki67. Tali anticorpi possono derivare dal coniglio, topo, ratto, uomo o cane. Un linfoma sarà di *fenotipo T* quando risulterà CD3+, CD79a-, CD21-, cIg/sIg- e potrà essere positivo anche per altre molecole quali il CD4, CD8, CD5.

Un linfoma sarà di *fenotipo B* quando invece risulterà CD3-, CD4-, CD8-, CD79a+, CD21+, cIg/sIg+. Il Ki67 rappresenta l'antigene di proliferazione che indica se la cellula ha intrapreso il ciclo cellulare. Questo è riconosciuto dall'anticorpo mib-1 [74]. Nello studio di Teske citato prima [71], l'applicazione di questa tecnica su 95 casi di linfoma ha portato al seguente risultato: nel 58.9 % dei casi erano interessate le cellule B, nel 37.9% dei casi erano colpiti i linfociti T e 3 casi sono stati definiti come non-T/non-B. Il dato interessante emerso da questo studio è che, a differenza del quadro di distribuzione del NHL dell'uomo nei paesi occidentali, nella popolazione canina esiste un'elevata percentuale di linfomi delle cellule T [71].

1.4 Aspetti citologici dei principali tipi di linfoma

Linfocitico

Non è mai stato rilevato nel cane un linfoma linfocitico in senso stretto, ma solo invasioni linfonodali da parte di leucemie; questo spiega come mai la diagnosi è spesso tardiva ed è contemporanea all'infiltrazione midollare e all'invasione sanguigna delle cellule maligne. Si presenta come un tappeto di cellule omogenee, composto da piccoli linfociti molto simili a quelli normali. Essi infatti, sono caratterizzati da un nucleo rotondo, cromatina addensata e a zolle, nucleoli invisibili. Il citoplasma è poco esteso, pallido o leggermente basofilo. Le mitosi sono eccezionali e questo ne spiega la crescita lenta.

Linfoplasmocitico

Detto anche immunocitoma, questo tipo di linfoma si caratterizza per il fatto che una percentuale variabile di cellule presenta una differenziazione plasmocitaria. Tale differenziazione consiste in una eccentricità del nucleo, in una estensione del citoplasma nettamente basofilo, e nella presenza in alcune cellule di un'area più chiara iuxta-nucleare (zona dell'apparato di Golgi). L'assenza di mitosi, di macrofagi fagocitanti, nonché di centroblasti

ed immunoblasti ne sottolineano il carattere linfomatoso e ne permettono la differenziazione nei confronti di una iperplasia plasmocitaria.

Prolinfocitico

Secondo la classificazione di Kiel aggiornata, può avere sia fenotipo T che B. Sono caratterizzati da una predominanza di cellule di taglia piccola che hanno nuclei con cromatina densa e nettamente nucleolata, citoplasma a corona stretta. Sono linfomi a crescita lenta.

Centrocitico

Questo tipo di linfoma è assai raro. Si identifica con la presenza di una popolazione cellulare, di numero variabile, caratterizzata da un nucleo di taglia leggermente superiore a quello dei linfociti normali, che presenta una incisura più o meno profonda. La cromatina è sempre *a zolle*, ma un po' meno addensata rispetto ai linfociti normali.

Centroblastico-Centrocitico

Linfoma assai raro nel cane, caratterizzato dalla presenza di cellule di taglia variabile piccole e medie. Le cellule più piccole presentano le caratteristiche dei centrociti (da ricercare le incisure nucleari, talvolta poco evidenti), mentre le cellule medie sono rappresentate da centroblasti le cui caratteristiche sono: cromatina fine, numerosi nucleoli addossati alla membrana nucleare, nucleo talvolta irregolare e citoplasma basofilo. La presenza di un miscuglio di centrociti e centroblasti può far pensare erroneamente ad una iperplasia follicolare; il carattere disperso dei centroblasti, l'assenza di plasmocitosi e di macrofagi fagocitanti, nonché il ridotto indice mitotico ne confermano il carattere tumorale.

A cellule medie macronucleolato

Questo tipo è caratterizzato da una grande omogeneità di cellule tumorali di taglia variabile piccola-media (1.5 volte il volume di una emazia). Il nucleo di tali cellule presenta cromatina decondensata ed un voluminoso nucleolo centrale il cui contorno è sottolineato da un rinforzamento della cromatina. Il citoplasma è poco esteso, moderatamente basofilo (senza area chiara iuxta-nucleare). L'indice mitotico è ridotto e rispondono negativamente al marker di proliferazione Ki-67. Sembra che le cellule tumorali di questo linfoma derivino dalla zona marginale del follicolo secondario del linfonodo.

Centroblastico monomorfo

Questo tipo di linfoma è poco frequente ed è caratterizzato da una popolazione omogenea di cellule grandi (taglia superiore al volume di due emazie). Le cellule linfomatose presentano un nucleo rotondo, cromatina fine e numerosi nucleoli in posizione iuxta-nucleare, un citoplasma stretto di media basofilia. Grado di malignità elevato.

Centroblastico polimorfo

La maggior parte dei linfomi del cane, appartiene a questo gruppo che, come indica il nome, è costituito da più tipi cellulari. Sul preparato linfonodale infatti si possono ritrovare cellule di taglia media, rappresentate dai centroblasti (in percentuale elevata), piccole cellule blastiche con nucleo rotondo, cromatina decondensata e irregolarmente rinforzata, nucleoli multipli e prominenti, citoplasma stretto e iperbasofilo (anch'esse presenti in percentuale assai elevata); cellule di taglia grande di tipo immunoblastico (mai superiori al 20%) e cellule medie macronucleolate della zona marginale (presenti in percentuale minore). Sono frequenti i macrofagi fagocitanti che, per la loro particolare distribuzione in mezzo alle cellule linfomatose, assumono il cosiddetto aspetto *a cielo stellato*. L'indice mitotico è variabile: da medio

ad elevato. Questo tipo di linfoma proprio per il suo carattere eterogeneo, può essere ulteriormente diviso in due sottogruppi: uno in cui predominano le piccole cellule (PSC ovvero *predominantly small cell*), l'altro in cui predominano le cellule più grandi (PLC che significa *predominantly large cell*).

Immunoblastico

Linfoma poco frequente e talvolta difficile da distinguere dal precedente. Caratterizzato da una elevata percentuale di cellule di tipo immunoblastico (maggiori dell'80%) che presentano le seguenti caratteristiche: taglia molto grande, nucleo irregolare, volume nucleolare elevato, citoplasma abbondante. Talvolta si può ritrovare una stretta differenziazione plasmocitaria. L'indice mitotico è alto. Può avere fenotipo sia B che T, anche se nel cane quest'ultimo non è mai stato descritto finora.

Tipo Burkitt

Questo tipo di linfoma è caratterizzato da una proliferazione omogenea di cellule di taglia piccola, con nucleo rotondo, cromatina irregolarmente rinforzata, nucleoli multipli o singoli prominenti, citoplasma ridotto e iperbasofilo. L'indice mitotico è elevato.

Plasmocitoide

Secondo la classificazione di Kiel aggiornata, questo tipo di linfoma può presentare entrambi i fenotipi, sia B che T. Caratterizzato da cellule di taglia piccola che assumono una differenziazione plasmocitaria grazie al loro citoplasma esteso ed iperbasofilo. L'indice mitotico è elevato.

Linfoblastico

Linfoma caratterizzato dalla proliferazione di cellule piccole-medie con nucleo irregolare, spesso convoluto, cromatina fine, decondensata, nucleoli discreti

poco evidenti, citoplasma moderatamente esteso e basofilo, può essere unipolare. Indice mitotico elevato con numerose mitosi raggruppate. Secondo la classificazione di Kiel aggiornata può avere entrambi i fenotipi.

A piccole cellule chiare

Linfoma appartenente al gruppo T con basso grado di malignità (in base alla Update Kiel Classification). Si caratterizza per la presenza di un contingente di piccole cellule tumorali presentanti le medesime atipie: citoplasma pallido ed esteso che talvolta può contenere fini granulazioni azzurrofile.

Pleomorfi

Questi tipi di linfomi possono a loro volta essere suddivisi in tre gruppi: il primo caratterizzato da cellule di taglia piccola e da un indice mitotico basso; il secondo caratterizzato da un miscuglio di cellule di taglia piccola-media e facente parte dei linfomi con grado di malignità elevato; il terzo costituito da cellule di taglia grande e grado di malignità elevato. Presentano tutti un fenotipo T e sono caratterizzati dall'avere un nucleo irregolare, una cromatina fine ed un citoplasma chiaro, scarsamente basofilo.

Micosi Fungoide

Linfoma T cutaneo primariamente epidermotropo che secondariamente può invadere anche i linfonodi loco regionali. La morfologia di questo linfoma è variabile; si possono infatti avere cellule con nucleo cerebriforme, cellule di aspetto monocitoide, entrambe con cromatina fine e citoplasma abbondante e chiaro, ed infine grandi cellule granulose con citoplasma pallido contenente delle grosse granulazioni azzurrofile. Fanno parte dei linfomi T a basso grado di malignità della classificazione di Kiel aggiornata.

Anaplastico

Contemplato nella prima classificazione di Kiel, manca invece nella forma aggiornata. Caratterizzato dalla presenza di cellule di taglia grande, nucleo molto irregolare, talvolta binucleato, citoplasma esteso ed intensamente basofilo. Possono essere presenti anche cellule pseudo-Sternberg.

1.5 Sintomi clinici

Nel linfoma non esiste una sintomatologia costante e specifica, le manifestazioni cliniche variano, infatti, da caso a caso, a seconda del soggetto e della forma anatomo-clinica del linfoma. Abbiamo già ricordato nel precedente capitolo le quattro forme in cui viene diviso il linfoma, in funzione della localizzazione anatomica del processo (multicentrica, alimentare, mediastinica, extranodale) [57]; ne analizziamo ora le caratteristiche cliniche.

Nella forma *multicentrica* spesso i sintomi sono vaghi e aspecifici e i proprietari possono accorgersi casualmente della presenza di masse sottocutanee: il reperto più frequente infatti è una linfadenomegalia localizzata o generalizzata e questo rappresenta comunemente il motivo della visita veterinaria. I linfonodi coinvolti sono soprattutto quelli superficiali (in particolare quelli posizionati nella parte anteriore dell'animale) e in misura minore anche quelli profondi; si presentano non dolenti alla palpazione, facilmente spostabili e freddi [57]. Quest'adenopatia è dovuta alla sostituzione parziale o completa della normale architettura del linfonodo da parte dei linfociti maligni [20]. Numerosi sono i segni aspecifici che accompagnano questa forma, tra cui dimagrimento, anoressia, vomito, diarrea, polidipsia, poliuria, astenia, febbre, debolezza muscolare e segni funzionali quali disfagia, per ingrossamento dei linfonodi sottomandibolari, retrofaringei o delle tonsille, dispnea o discordanza respiratoria per compressione dell'albero respiratorio da parte dei linfonodi e edema da stasi nel deflusso della linfa [20, 57]. Ci può essere coinvolgimento più o meno marcato di fegato, milza e tonsille che



Figura 1.2: Linfadenomegalia del linfonodo sottomandibolare sinistro in un Golden retriver di 12 anni con linfoma.

diventano prominenti dalla loro sede e contribuiscono alla disfagia, come anche il timo che può determinare megaesofago e rigurgito. L'infiltrazione del midollo osseo può essere presente con o senza segni associati di disfunzione midollare, come i disordini mieloproliferativi (ad es., leucemia) che si distinguono per la marcata infiltrazione linfoide neoplastica, il ridotto numero di precursori eritroidi e la ridotta attività mieloide; inoltre si può avere anche riduzione del numero dei megacariociti [63, 54]. Conseguenze dirette di queste disfunzioni saranno anemie, infezioni ed emorragie. L'evoluzione della sintomatologia è progressiva e l'esito finale è sempre la morte del soggetto.

Nella forma *alimentare* generalmente abbiamo una sintomatologia a carico del tratto gastroenterico come vomito, anoressia, diarrea, perdita di peso, occlusione intestinale, peritonite (per rottura della massa linfomatosa), ecc. Questa forma è caratterizzata dalla presenza di una o più masse in cavità addominale che possono essere ricondotte o meno a linfonodi mesenterici ipertrofici e/o ad un ispessimento delle anse intestinali. Meno frequentemente ci può essere anche aumento di volume di fegato e milza [57]. Nella fase terminale si riscontra un'esacerbazione dei sintomi, con possibile perforazione di ulcere gastriche associate al tumore [17].

Nella forma *mediastinica* le anomalie sono quasi sempre localizzate nella cavità toracica e sono determinate dall'ipertrofia dei linfonodi mediastinici. I sintomi tipici sono dispnea, tosse, disfagia, rigurgito e facile affaticamento. Le manifestazioni cliniche a carico dell'apparato respiratorio e del primo tratto di quello digerente sono dovute alla compressione esercitata da parte del linfonodo mediastinico craniale sugli organi. Sempre in seguito alla compressione dei linfonodi mediastinici, si può avere un versamento pleurico, che contribuisce a determinare ed aggravare la sintomatologia respiratoria: si avrà infatti diminuzione del normale murmure vescicolare, spostamento della normale sonorità polmonare nelle aree dorso-caudali e suono ottuso alla percussione nelle parti più ventrali. La maggior parte di questi animali presenta ipercalcemia e i sintomi conseguenti saranno poliuria e polidipsia [57]. Alcuni cani possono sviluppare inoltre una sindrome della vena cava anteriore, presentando un imponente edema della testa, collo e arti toracici [75].

Le forme *extranodali* si presentano con una sintomatologia diversa e tipica a seconda del distretto interessato.

Il linfoma *cutaneo* può essere generalizzato o multifocale e si presenta sotto forma di noduli, placche, ulcere, dermatite erosiva eritematosa, desquamazione, alopecia, croste e prurito (poco frequente). Può essere coinvolta la mucosa orale e le giunzioni mucocutanee con placche e noduli eritematosi. Il tumore cutaneo può essere primario o derivare da altri siti anatomici. Dal punto di vista istologico il linfoma cutaneo può suddividersi nei tipi epidermotropici (in genere di tipo T) e non epidermotropici (in genere di tipo B); nella maggior parte dei casi, il linfoma cutaneo del cane appartiene al sottotipo T. Nel cane sono state segnalate la *micosi fungoide* e la *sindrome di Sèzary* (variante della precedente). I soggetti colpiti da micosi fungoide (linfoma a cellule T epidermotropo) presentano alopecia, desquamazione cutanea, prurito e eritema, lesioni che porteranno alla formazione di una placca

cutanea di aspetto neoplastico. Una lesione caratteristica dei cani colpiti da questa forma di linfoma è costituita da una massa dermoepiteliale a contorno circolare, rilevata, eritematosa che al suo centro può contenere parti di cute ancora integre, simile a una ciambella [55, 57].

Il linfoma del *sistema nervoso* può essere centrale o periferico (meno frequente), di origine metastatica o primario; il tumore può mostrare un coinvolgimento locale isolato oppure multifocale. Sul piano clinico si possono distinguere tre forme fondamentali: il linfoma solitario epidurale, il linfoma del neuropilo (intracranico o intraspinale) e quello dei nervi periferici. I segni neurologici da interessamento centrale possono essere crisi convulsive, paresi, paralisi, alterazioni comportamentali, ecc. [15]. In alcuni casi può accadere che nei cani sottoposti a chemioterapia protratta per una forma multicentrica, il linfoma recidivi sotto forma di localizzazione a carico del sistema nervoso centrale e questo fenomeno è probabilmente dovuto al fatto che la maggior parte dei farmaci usati per trattare il linfoma non è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica ai dosaggi standard [57].

Il linfoma *oculare* nel cane è generalmente associato alla forma multicentrica. Si può riscontrare un'ampia gamma di sintomi e lesioni: fotofobia, blefarospasmo, epifora, ifema, ipopion, sinechie, uveite anteriore, distacchi retinici bollosi completi, esoftalmo e glaucoma secondario [11].

In rari casi sono state documentate le lesioni del linfoma in altre sedi anatomiche: muscolatura scheletrica [35], pene [53], vescica [50], scheletro [21], area nasale [39].

1.6 Alterazioni emato-biochimiche

Nei cani con linfoma è possibile osservare una varietà di alterazioni ematologiche e biochimiche non specifiche, ma che possono comunque esser d'aiuto nella formulazione della diagnosi e soprattutto per stabilire la presenza di alterate funzioni di organi principali.

In linea generale si può affermare che l'emogramma può evidenziare un'anemia (38-40% dei casi [47, 37]) che può essere dovuta a più fattori concomitanti: emolisi immunomediata, infiltrazione del midollo osseo, malattie infiammatorie croniche, sindrome da eritropoiesi inefficace conseguente alla terapia. In rapporto alla causa l'anemia può essere quindi di tipo rigenerativo macrocitica normocromica con incremento in circolo delle emazie nucleate, policromasia, sferocitosi e Test di Coomb's positivo nel caso di anemia emolitica immunomediata e di tipo non rigenerativo, normocitico normocromico nei processi infiltrativi del midollo o come conseguenza della terapia antitumorale.

La leucocitosi neutrofilica con o senza deviazione a sinistra e modesta monocitosi è un altro reperto assai frequente (27-39% dei casi) e può essere la diretta conseguenza di un danno tissutale o di processi necrotici dovuti all'infiltrazione delle cellule linfomatose nei tessuti ed organi. La leucopenia è stata osservata soltanto nel 9-12% dei cani con NHL [47, 37].

Nel 20% dei cani è stata riscontrata linfocitosi, nel 25% linfopenia [49].

La trombocitopenia, riscontrata in circa il 50% dei cani, non crea problemi di tipo emorragico ed è probabilmente di origine immunomediata [48].

Il riscontro di forme leucemiche è strettamente correlato alle tecniche diagnostiche utilizzate: la biopsia midollare *a core* è in grado di svelare il 55% dei casi, contro il 34% dell'aspirato e il 28% dello striscio di sangue periferico. In queste forme leucemiche si può osservare la presenza in circolo di linfoblasti, prolinfociti o linfociti immaturi [63].

Dalla valutazione dei profili di laboratorio sono talvolta evidenziabili *sindromi paraneoplastiche* associate al tumore. La più frequente tra queste in corso di linfoma è l'ipercalcemia (valori superiori a 12 mg/dl), riscontrata soprattutto nei cani colpiti dalla forma mediastinica della malattia e nei linfomi a cellule T; la causa sembra imputabile al rilascio, da parte delle cellule tumorali, di una sostanza PTH-simile con attività osteoclastica (PTRrp:

PTH-related protein), che determina la mobilitazione e il riversamento in circolo del calcio osseo [51, 78].

Altra alterazione paraneoplastica, di più raro riscontro rispetto alla precedente, è l'iperproteinemia: l'elettroforesi delle proteine sieriche può rilevare picchi paraproteici monoclonali di tipo IgG, IgA o IgM prodotti da linfociti maligni di tipo B. In alcuni casi si può riscontrare anche una gammopatia policlonale. Conseguenze di quest'alterazione possono essere fenomeni di iperviscosità ematica e proteinuria di Bence-Jones [8, 57].

Infine si possono riscontrare tutta una serie di alterazioni biochimiche dovute ad una insufficienza d'organo secondaria all'infiltrazione neoplastica, diverse a seconda dell'organo coinvolto.

1.7 Diagnosi

Per formulare una corretta diagnosi di linfoma non ci si può basare esclusivamente sui rilievi della visita clinica, vista l'assenza di sintomi patognomnici e la variabilità di essi.

Oltre agli esami ematologici e biochimici (citati nel precedente paragrafo), può essere utile ricorrere alla diagnostica per immagini (esame radiologico ed ecografico), soprattutto nei casi in cui la linfadenopatia periferica è limitata o assente e può fornire utili informazioni circa l'estensione della malattia. L'esame radiografico del torace può mettere in evidenza: linfadenopatia sternale e/o tracheobronchiale, infiltrati polmonari, versamento pleurico (raro) nel linfoma multicentrico [3] oppure linfadenopatia mediastinica craniale nella forma mediastinica. A livello addominale sia l'esame radiografico che ecografico possono rilevare la presenza di epatomegalia, splenomegalia, renomegalia, presenza di masse endoaddominali; l'ecografia è particolarmente utile in caso di sospetto linfoma alimentare per evidenziare alterazioni a carico della parete intestinale, oltre che linfadenopatie, masse spleniche, versamenti addominali.

Tuttavia, a questo livello d'indagini la nostra diagnosi di linfoma sarà soltanto presuntiva: occorre invece che sia confermata da esami più specifici.

La tecnica più semplice per giungere a una diagnosi certa di linfoma è sicuramente l'esame citologico del campione prelevato per aspirazione ad ago sottile (FNA = *Fine Needle Aspiration*) dai linfonodi o dagli organi interessati. Questa tecnica è molto utile soprattutto in caso di linfoma multicentrico; nelle altre forme, in cui può non esser presente il coinvolgimento dei linfonodi superficiali, l'esito dell'esame potrà invece risultare negativo senza far escludere però la possibilità di un linfoma.

Per una valutazione ancora più specifica del tessuto linfonodale si può ricorrere all'esame istopatologico di un campione di linfonodo o di massa prelevati chirurgicamente, tuttavia generalmente questo viene richiesto in un secondo tempo e solo se strettamente necessario, per i seguenti motivi: la citopunzione linfonodale, necessaria per l'esame citologico, è sicuramente una tecnica assai semplice, poco onerosa e poco invasiva, più facile da accettare per il proprietario, rispetto ad una exeresi chirurgica del linfonodo stesso.

Dopo aver confermato la diagnosi di linfoma, il passo successivo è la stadiazione della malattia, al fine di ottenere una prognosi e per impostare un corretto protocollo terapeutico. Nel paragrafo relativo alla classificazione abbiamo già ricordato il sistema di stadiazione messo a punto dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, derivato dal metodo TNM per la valutazione delle neoplasie umane (vedi tabella 1.2). Gli esami da eseguire per la valutazione dello stadio clinico saranno: esame emocromocitometrico completo, profilo biochimico, analisi dell'urina, tecniche di diagnostica per immagini. In aggiunta a questi si può ricorrere anche ad un prelievo ed esame del midollo, che ci consente di valutare se vi è stata o meno una colonizzazione midollare da parte delle cellule neoplastiche e stabilire quindi se si tratta di una forma di linfoma leucemico.

Nel paragrafo sulla classificazione abbiamo già fatto riferimento alle tec-

niche di tipizzazione immunofenotipica per la determinazione del fenotipo d'origine (B o T) della neoplasia, pratica ormai ampiamente diffusa tra i medici veterinari oncologi. Lo sviluppo infatti di anticorpi monoclonali diretti contro antigeni leucocitari canini ha permesso di effettuare anche in medicina veterinaria l'analisi immunofenotipica dei linfomi nel cane, attraverso tecniche di immunoistochimica (su campioni biotici fissati in formalina) e/o di flussocitometria (su campioni prelevati per aspirazione e sospesi in PBS, phosphate-buffered saline solution). Secondo queste tecniche i linfomi vengono classificati come *fenotipo T* se dimostrano una reazione positiva nei confronti dei markers delle cellule T (ad esempio CD3, CD4 o CD8); inoltre contemporaneamente devono dimostrare una reazione negativa nei confronti dei marker B. Viceversa i linfomi vengono classificati come *fenotipo B* se reagiscono positivamente verso i markers delle cellule B (ad esempio CD21) e negativamente all'anti-CD3. Infine, se le prove risultano sempre negative, i linfomi vengono classificati come *non-T/non-B* [71, 7, 25]. L'importanza di questa tipizzazione risiede nel fatto che il fenotipo in causa rappresenta un fattore prognostico importante, come vedremo nel prossimo paragrafo, particolarmente utile per la previsione del comportamento biologico della malattia e per l'impostazione di un adeguato piano terapeutico.

1.8 Fattori prognostici

Il comportamento biologico del linfoma canino è sempre molto aggressivo per cui la sopravvivenza senza terapia è di solito limitata a poche settimane. La regressione spontanea è riportata in un solo caso [66] e del quale si nutre a tutt'oggi dei dubbi. Molti fattori prognostici sono stati presi in considerazione per la determinazione del trattamento e della sopravvivenza dei cani affetti da linfoma.

L'età e il peso sembrano non avere alcuna influenza, al contrario del sesso: da alcuni studi è risultato che le femmine hanno tempi di sopravvivenza

maggiori rispetto ai maschi e si è ipotizzato che questo potrebbe essere dovuto ad una influenza che gli ormoni sessuali potrebbero avere sulle modalità di crescita cellulare e sulla differenziazione dei linfociti; tuttavia non è stata dimostrata la presenza di recettori per estrogeni e testosterone né sui linfociti normali né sulle cellule neoplastiche di cani colpiti da linfoma [44, 76].

Un fattore prognostico molto dibattuto è lo stadio clinico: cani con linfoma ai primi stadi (I-III) sembrano avere una prognosi migliore rispetto a quelli al IV-V stadio. I tempi di sopravvivenza sono inoltre ridotti in quei cani che presentano segni sistemici (substadio b) quali febbre, depressione, coagulopatie, sintomi gastroenterici, ecc... rispetto a quelli che non presentano segni sistemici (substadio a). La presenza di ipercalcemia non sembra avere invece, nessun valore prognostico anche se va ricordato che è generalmente associata all'immunofenotipo T [65].

Per quanto riguarda la sede anatomica, in caso di linfosarcoma mediastinico craniale la remissione e la sopravvivenza sono più brevi [75].

Grande importanza ai fini prognostici è rivestita dal tipo istologico a cui appartiene il linfoma. I linfomi ad alto grado di malignità della classificazione di Kiel risulterebbero avere, a seguito del trattamento antiblastico, una maggiore frequenza di remissione completa (avendo un maggior numero di cellule in divisione, risulta più sensibile nei confronti dei farmaci chemioterapici, rispetto ad un linfoma di basso grado) però con periodi di remissione di durata minore rispetto a quelli a basso grado di malignità [68]. Classificando invece i linfomi secondo la Working Formulation (vedi tabella 1.7) questo aspetto risulta meno evidente, tuttavia questa classificazione ha il pregio di discriminare meglio in relazione ai tempi di sopravvivenza, che risultano più brevi nei linfomi ad alto grado di malignità [68].

Il fenotipo sembra essere un altro importante fattore prognostico: i linfomi T infatti hanno una prognosi più sfavorevole rispetto ai linfomi B e secondo Teske sono tutti di alto grado di malignità [68]. Tale opinione non è

condivisa da Fournel che ha dimostrato come molti linfomi T siano di basso grado di malignità [25].

Mentre nell'uomo è stato accertato che il riscontro di aberrazioni cromosomiche influenza negativamente i tempi di sopravvivenza, nel cane ancora non sono arrivate conferme in tal senso.

Tutti i fattori sopracitati sono strettamente correlati all'animale e al tipo di linfoma in causa; è importante però ricordare anche i fattori strettamente connessi al proprietario, il quale potrà essere influenzato dai costi dell'eventuale terapia, dalla disponibilità a condurre l'animale regolarmente alla visita medica di controllo, dalle probabilità e dai tempi di sopravvivenza e per questo dovrà essere adeguatamente motivato dal veterinario stesso. Il linfoma è una patologia molto aggressiva e l'esito finale resta comunque la morte del soggetto: il veterinario ed il proprietario possono però decidere di allungare la vita dell'animale e di migliorarla qualitativamente. La prognosi del linfoma infatti migliora notevolmente in animali trattati e varia anche in funzione dell'efficacia della chemioterapia che viene valutata in base a diversi parametri (ad esempio: completa o parziale remissione del volume dei linfonodi in seguito al trattamento; tempo di remissione prima che compaia una recidiva): in questo senso il veterinario rappresenta un fattore determinante proprio in base alla sua esperienza professionale e terapeutica.

1.9 Terapia

I tempi di sopravvivenza dei cani non trattati sono difficili da interpretare poiché il tempo che intercorre tra l'insorgenza della malattia e la diagnosi è variabile e incerto e poiché spesso i proprietari decidono di optare direttamente per l'eutanasia. Questi fattori possono spiegare la grande variabilità che esiste nel tempo di sopravvivenza medio per cani malati non trattati riportato in letteratura: da 10 a 99 giorni [5].

Il linfoma canino è una malattia sistemica e la guarigione è, come già

accennato, rara se non impossibile; attualmente il presidio più efficace per il controllo della malattia è rappresentato dalla *chemioterapia*⁵. E' importante ricordare che in medicina veterinaria però, a differenza che nell'uomo, questa modalità terapeutica è essenzialmente palliativa: lo scopo principale è quello di migliorare la qualità della vita del paziente, permettendo quindi al proprietario di ritardare il momento dell'eutanasia. Con i protocolli attualmente impiegati si riescono ad ottenere tassi di risposta nell'80–90% dei cani e tempi di sopravvivenza mediani di 250–300 giorni (pari a 42.8 settimane: 10.7 mesi). Tuttavia il range dei tempi di sopravvivenza è considerevole (8-15 mesi) e in alcuni cani non si riesce mai ad ottenere una remissione [68].

L'efficacia di una terapia antineoplastica viene valutata in base a diversi parametri, per cui si parla di:

- *completa remissione* (CR): quando la riduzione del volume dei linfonodi, del fegato e della milza sono superiori al 75%;
- *parziale remissione* (PR): quando la riduzione degli organi coinvolti è del 50%;
- *tempo di remissione*: indica la durata della risposta al trattamento con la completa scomparsa dei sintomi legati alla malattia neoplastica fino all'insorgenza di una recidiva;
- *tempo di sopravvivenza*: è il periodo di tempo che intercorre tra la diagnosi o l'applicazione del primo trattamento e la morte naturale.

1.9.1 Principi di chemioterapia

In linea generale si può affermare che gli antitumorali citotossici sono più attivi sulle cellule che sono in rapida proliferazione e questo si verifica quando il tumore è ancora piccolo: aumentando di dimensioni, infatti, si riduce

⁵Per *chemioterapia* si intende l'utilizzazione di farmaci che provocano la morte o l'inibizione della crescita di cellule estranee all'organismo (virus, batteri) ed in questo senso anche le cellule cancerose possono essere considerate tali: rappresenta la principale modalità terapeutica per il trattamento delle neoplasie maligne sistemiche o metastatiche.

la velocità di crescita poiché diminuisce il numero di cellule nella fase attiva del ciclo cellulare e aumenta quello di cellule morte per apporto vascolare insufficiente; inoltre aumenta la probabilità che si verifichino mutazioni cellulari che comportano lo sviluppo di resistenza alla chemioterapia. La *resistenza genetica* consiste in una resistenza biochimica delle cellule neoplastiche ai farmaci (ad esempio per diminuita penetrazione intracellulare del farmaco, carenza di trasporto del farmaco, insufficiente attivazione del farmaco, alterazione dei processi riparativi del DNA, ecc...), origina in una singola cellula mutante e viene trasferita poi alle cellule figlie: rappresenta il principale responsabile di insuccessi terapeutici, anche perché caratterizzato da irreversibilità⁶ [13].

Proprio per ridurre il rischio di comparsa di resistenza la prassi comune è quella di ricorrere alla chemioterapia combinata: si associano cioè due o più farmaci per sfruttare al meglio l'effetto tossico dei diversi agenti chemioterapici. In questo modo si ottengono remissioni più prolungate e tempi di sopravvivenza più lunghi rispetto all'utilizzo di un singolo farmaco, poiché si ritarda lo sviluppo di cloni cellulari farmaco-resistenti. Inoltre la sommazione o il potenziamento degli effetti di più farmaci sulle cellule tumorali sono più manifesti che sulle cellule normali e l'associazione può risultare meno tossica di un singolo farmaco a parità di efficacia. L'uso di combinazioni di chemioterapici non evita però il fenomeno della cosiddetta resistenza multipla (*multiple drug resistance*, MDR), un tipo di resistenza particolare che si può verificare nei confronti di farmaci del tutto diversi sotto il profilo strutturale, quali le antracicline (doxorubicina), gli alcaloidi della Vinca (vincristina) ed altri. Questo fenomeno sembra esser dovuto ad un aumento nelle cellule tumorali dei livelli della glicoproteina-P, una proteina di pompa transmem-

⁶Altri tipi di resistenza tumorale alla chemioterapia sono la *resistenza farmacocinetica* (dovuta alla presenza di ridotte concentrazioni di farmaco nella sede del tumore e può dipendere da modificazioni nell'assorbimento, nella distribuzione, nella trasformazione e nell'eliminazione del farmaco stesso) e la *resistenza ciclo-dipendente* (dovuta alla presenza di un numero ridotto di cellule in una fase sensibile al farmaco) [13]

branaria in grado di estrarre i farmaci dalle cellule tramite un meccanismo ATP-dipendente, responsabile quindi di una ridotta penetrazione di farmaco all'interno delle cellule tumorali [13].

Per quanto riguarda i dosaggi, per la maggior parte dei farmaci antitumorali questi sono calcolati in base alla superficie corporea (m^2) e non in base al peso, secondo la seguente formula:

$$m^2 \text{ di superficie corporea} = \frac{\text{Peso (g)}^{2/3} \times K}{10^4}$$

dove K è una costante pari a 10.1 nel cane e 10 nel gatto. In questo modo si tiene conto del fatto che gli animali piccoli hanno un metabolismo più elevato e perciò devono ricevere un dosaggio più alto rispetto a quello che riceverebbero con un calcolo sulla base del loro peso [14].

1.9.2 Farmaci antitumorali

I farmaci antitumorali agiscono attraverso differenti meccanismi d'azione e sono comunemente classificati nelle seguenti categorie:

Alchilanti. Formano legami crociati covalenti con i filamenti di DNA impedendone la duplicazione; sono molto efficaci sulle cellule in rapida moltiplicazione, per questo la tossicità si esplica soprattutto sul midollo osseo e sul sistema gastroenterico. Comprendono: *ciclofosfamida*, *clorambucile*, *melfalan*, *cisplatino*, *carboplatino*.

Antimetaboliti. Sono composti simili ai normali metaboliti cellulari e possono competere con questi nelle reazioni enzimatiche normali, rallentando i processi cellulari fondamentali, oppure possono sostituirsi a questi come substrati, portando alla sintesi di sostanze anomale che interferiscono con il ciclo di crescita. Comprendono: *citosina-arabinoside*, *metotrexato*, *azatioprina*, *5-fluorouracile*.

Antibiotici antitumorali. Agiscono attraverso molti meccanismi, tra i quali c'è il danneggiamento cellulare ad opera di radicali liberi o per inter-

ferenza con la topoisomerasi. Di solito presentano resistenza crociata con gli altri della stessa classe e con farmaci di altre classi (vincristina, paclitaxel, etoposide). Comprendono: *doxorubicina*, *bleomicina*, *actinomicina D*, *mitoxantrone*.

Alcaloidi delle piante. Comprendono i derivati della *Vinca rosea* (*vincristina*, *vinblastina*), che provocano l'arresto in metafase del ciclo di replicazione cellulare per rottura del fuso mitotico, e i derivati del *Podophyllum peltatum* (*etoposide*), che interagiscono col DNA, inibendone la sintesi.

Ormoni. I corticosteroidi (*prednisone*) esercitano un'azione palliativa nel caso di tumori non linfoidi (riducono infiammazione ed edema) ed azione citotossica nel caso di neoplasie linforeticolari (determinano apoptosi dei linfociti attraverso il legame con i recettori nucleari dei glucocorticoidi) e mastocitomi. Il loro uso in realtà non è consigliato come singoli agenti terapeutici per i gravi effetti collaterali che inducono e poiché conducono alla comparsa rapida di resistenza⁷.

Altri. *L-asparaginasi* (è un enzima che idrolizza l'asparagina ad acido aspartico ed ammoniaca; poiché molte cellule tumorali maligne contengono bassissime concentrazioni di L-asparagina-sintetasi, per sopravvivere devono assumere l'asparagina dai liquidi extracellulari: l'eliminazione dal circolo di tale molecola provoca la morte delle cellule tumorali), *dacarbazina* (composto triazinico; sembra che agisca sia come agente alchilante che come antimetabolita).

⁷Uno studio di Price del 1991 [60] riporta che la durata della remissione in cani con linfoma che hanno ricevuto glucocorticoidi prima della chemioterapia è stata significativamente inferiore rispetto a quelli non trattati in precedenza con tali farmaci. L'ipotesi comune è che i glucocorticoidi agiscano mediante un meccanismo di up-regulation sull'espressione della glicoproteina-P nelle cellule tumorali canine. Tale ipotesi non è stata ancora dimostrata, tuttavia, anche sulla base di osservazioni aneddotiche di numerosi veterinari, la raccomandazione generale è che il ricorso ai glucocorticoidi in pazienti affetti da linfoma canino dovrebbe essere evitato, se si ha intenzione di impostare un protocollo chemioterapico per il futuro.

1.9.3 Tossicità della chemioterapia

Uno dei problemi principali della chemioterapia è che la maggior parte degli agenti tumorali è scarsamente selettiva nei confronti delle cellule bersaglio: essendo il processo di replicazione cellulare simile nelle cellule neoplastiche e in quelle normali, oltre ai tessuti neoplastici in attiva proliferazione, verranno distrutti anche alcuni dei tessuti normali a rapida crescita dell'individuo, per questo è estremamente importante dosare accuratamente i farmaci da usare, rispettare gli intervalli tra una somministrazione e l'altra e la via di somministrazione, monitorare costantemente il paziente attraverso analisi emato-biochimiche, al fine di evidenziare precocemente la comparsa degli effetti collaterali.

All'interno del midollo osseo le cellule più sensibili agli effetti tossici dei chemioterapici sono i precursori ematopoietici, per il loro elevato indice mitotico. La *mielosoppressione* che ne deriva determina a sua volta un'imponente citopenia con interessamento delle linee cellulari in tempi diversi, a seconda del tempo di transito nel midollo e dell'emivita nel sangue: neutropenia (da 5 a 7 giorni dall'inizio della terapia si verifica il nadir⁸ dei neutrofil, dopodichè il loro valore risale e tende a riportarsi nella norma entro 36-72 ore), trombocitopenia (da 1 a 2 settimane dall'inizio della terapia) e anemia (da 3 a 4 mesi dall'inizio della terapia). I farmaci responsabili di tale effetto collaterale sono soprattutto doxorubicina, ciclofosfamide e vinblastina, mentre clorambucile, metotrexate, vincristina, 5-fluorouracile ne inducono una più moderata. Prima di intraprendere un trattamento chemioterapico è buona norma effettuare un conteggio completo delle cellule ematiche per assicurarsi che siano presenti almeno 3.000 neutrofil/ μL e 100.000 piastrine/ μL : se i valori riscontrati sono inferiori è meglio ritardare la somministrazione di almeno una settimana. Qualora si presenti grave mielosoppressione si consiglia di somministrare antibiotici a scopo profilattico e interrompere il tratta-

⁸Nadir: valore più basso.

to chemioterapico finchè i valori di neutrofili e piastrine non tornano nella norma; quando la terapia viene ripresa, è indicato somministrare il 75% della dose iniziale e incrementarla progressivamente [58].

Anche la *mucosa gastroenterica* è sede di veloce rinnovamento cellulare e quindi fortemente chemiosensibile. I sintomi clinici comprendono nausea, vomito, inappetenza, anoressia o diarrea, anche se questi sembrano essere meno frequenti negli animali che nell'uomo. I farmaci principalmente responsabili di nausea e vomito sono: dacarbazina, cisplatino, doxorubicina, metotrexato, actinomicina D, ciclofosfamide e 5-fluorouracile.

La somministrazione di L-asparaginasi per via intravenosa o intraperitoneale, l'inoculazione rapida di doxorubicina e la somministrazione per via endovenosa di etoposide può determinare *reazioni di ipersensibilità acuta* per liberazione di istamina dai mastociti: scuotimento della testa, orticaria ed eritema generalizzati, irrequietezza, vomito, diarrea, raramente collasso.

A livello cutaneo si può avere: *necrosi tissutale localizzata* (consegue a stravasamento di vincristina, vinblastina, actinomicina D, doxorubicina nei tessuti perivascolari: si avrà dolore, prurito, eritema, dermatite umida e necrosi dell'area interessata), *ritardo nella crescita del pelo* (interessa le zone in cui l'animale era stato tosato o rasato prima o durante la chemioterapia ed è dovuto al fatto che la maggior parte dei chemioterapici agisce sulle cellule in fase anagen⁹ del pelo), *alopecia* (meno frequente, si manifesta soprattutto nei cani con pelo lanoso o arricciato come i barboncini o gli schnauzer).

La somministrazione di doxorubicina può presentare una *cardiotossicità* acuta, non dose-dipendente, caratterizzata dalla comparsa di aritmie cardiache nel corso o subito dopo l'inoculazione, e una reazione cronica da accumulo, correlata alla dose totale di doxorubicina assunta (se superiore a 240 mg/m²) che determina la comparsa di una cardiomiopatia dilatativa, la quale può progredire fino all'insufficienza cardiaca congestizia.

⁹Fase anagen: di crescita.

A seguito di impiego prolungato di ciclofosfamide nel cane si può avere *cistite emorragica sterile* con pollachiuria, ematuria, disuria. Raramente si può verificare la comparsa di nefrotossicità nel cane, associata all'uso di cisplatino e di metotrexato a dosaggi medio-elevati.

1.9.4 Terapia del linfoma nel cane

Come detto più volte, la *chemioterapia* rappresenta quindi la principale modalità terapeutica per il trattamento del linfoma nel cane. Il trattamento chemioterapico si compone in genere di più fasi:

1. *Induzione della remissione*: si utilizza un protocollo chemioterapico relativamente aggressivo, al fine di indurre una rapida regressione del tumore, limitando la tossicità farmacologica; dura 6-8 settimane e gli animali devono essere esaminati una volta alla settimana.
2. *Intensificazione*: si applica solo se al termine della fase di induzione il paziente non è in completa remissione; in questo caso si utilizzano differenti protocolli terapeutici o si variano i dosaggi e le modalità di somministrazione dei farmaci precedentemente impiegati allo scopo di aumentarne l'efficacia.
3. *Mantenimento della remissione*: consiste nella riduzione dei dosaggi o nell'utilizzo di farmaci differenti per ridurre gli effetti tossici e diminuire le spese clinico-farmacologiche. E' ancora argomento di discussione l'utilità del ricorso alla terapia di mantenimento al fine di prolungare la durata della remissione [33].
4. *Reinduzione della remissione*: è un protocollo che si utilizza quando il tumore è recidivato, poiché generalmente in tutti i cani sottoposti a terapia di mantenimento si assiste alla comparsa di una recidiva a circa 6-8 mesi dall'inizio della fase di induzione. Le remissioni successive sono generalmente più brevi della prima.

Molti farmaci sono utilizzati nel trattamento del linfoma, ma un protocollo ottimale non è ancora stato definito, anche in relazione al fatto che ogni farmaco deve essere monitorato sulla base delle risposte e della tossicità soggettive. Attualmente con il ricorso alla chemioterapia combinata si riscontrano tassi di risposta dell'80-90% e tempi di sopravvivenza mediani di 250-300 giorni (8-10 mesi circa). Quasi tutti i protocolli di chemioterapia combinata sono molto simili e variano leggermente per quanto riguarda il dosaggio e la programmazione delle somministrazioni nel tempo degli stessi farmaci: ciclofosfamide, vincristina, L-asparaginasi, prednisone, doxorubicina.

Le migliori percentuali di risposta (88-96%) con periodi di remissione più lunghi (215-250 giorni) e prolungati periodi di sopravvivenza (350-356 giorni) si sono ottenuti con un protocollo comprendente PEG-L-asparaginasi, vincristina, ciclofosfamide e doxorubicina o metotrexate insieme a dosi decrescenti di prednisone [69, 46].

Per quanto riguarda la chemioterapia con un singolo agente si sono ottenuti buoni risultati con l'impiego di doxorubicina (percentuali di risposta: 75-87%) e L-asparaginasi (percentuali di risposta: 82%) [9, 59, 34]. Questi protocolli vengono consigliati tipicamente sulla base di fattori legati alle disponibilità economiche ed alla comodità del cliente.

Tra i protocolli più utilizzati in Italia per l'*induzione* della remissione troviamo il COP¹⁰ (percentuali di risposta: 70%; sopravvivenza mediana: 130 giorni) [27], il COAP¹¹, ed il CHOP¹², in quanto comprendenti farmaci disponibili presso le farmacie del nostro paese e ad un prezzo accettabile per il proprietario. La L-Asparaginasi, invece, non è reperibile in Italia e questo fattore limita notevolmente il ricorso a protocolli quali il VELCAP, l'ACOPA I o l'ACOPA II, salvo trovare proprietari disposti ad affrontare spese nettamente superiori per la cura del proprio animale (vedi tabella 1.8).

¹⁰COP: Ciclofosfamide, Vincristina, Prednisone.

¹¹COAP: Ciclofosfamide, Vincristina, Citosina arabinoside, Prednisone.

¹²CHOP: Ciclofosfamide, Doxorubicina, Vincristina, Prednisone.

Nome	Farmaco	Dosaggio	Schema
COP	Ciclofosfamide	50 mg/m ² PO	a gg alterni per 8 sett.
	Vincristina	0.5 - 0.7 mg/m ² IV	1 v./sett. per 8 sett.
	Prednisone	20 mg/m ² PO	sid per 1 sett, poi a gg alterni fino a recidiva
CHOP	Ciclofosfamide	50 mg/m ² PO	a gg alterni per 8 sett.
	Vincristina	0.5 - 0.7 mg/m ² IV	ai gg 8 e 15
	Prednisone	20 mg/m ² PO	sid per 1 sett, poi a gg alterni fino a recidiva
	Doxorubicina	30 mg/m ² IV	al giorno 1 di ciascun ciclo
COPA	Ciclofosfamide	50 mg/m ² PO	a gg alterni per 8 sett.
	Vincristina	0.5 mg/m ² IV	1 v./sett. per 8 sett.
	Prednisone	40 mg/m ² PO	sid per 1 sett, poi 20 mg/m ² PO a gg alterni
	Citarabina	100 mg/m ² IV	quotidianamente nei gg 1-4
VELCAP	Ciclofosfamide	250 mg/m ² PO	sett. 7, 12, 15, 21 e 24
	Vincristina	0.75 mg/m ² IV	sett. 1-3, 7, 12, 18, 21 e 27
	L-Asparaginasi	10000 UI/m ² IM	sett. 7-9, 24 e 25
	Doxorubicina	30 mg/m ² IV	sett. 2, 4, 18 e 27
	Prednisone	40 mg/m ² PO	sid per 1 sett, poi a gg alterni
ACOPA I	Vincristina	0.75 mg/m ² IV	sett. 1-4, 7, 10, 13 e 16
	L-Asparaginasi	10000 UI/m ² IM	sett. 1-4, 7, 10, 13 e 16
	Ciclofosfamide	250 mg/m ² PO	sett. 7, 13 e 16
	Doxorubicina	30 mg/m ² IV	sett. 10
	Prednisone	40 mg/m ² PO	sid per 1 sett, poi a gg alterni
ACOPA II	Vincristina	0.75 mg/m ² IV	sett. 4, 10, 13, 16, 19 e 22
	L-Asparaginasi	10000 UI/m ² IM	sett. 7-9, 24 e 25
	Ciclofosfamide	250 mg/m ² PO	sett. 4, 7, 13, 16 e 22
	Doxorubicina	30 mg/m ² IV	sett. 1, 10 e 19
	Prednisone	40 mg/m ² PO	sid per 1 sett, poi a gg alterni

Tabella 1.8: Alcuni comuni protocolli chemioterapici per l'induzione della remissione nel linfoma nel cane.

Tra i protocolli usati per la fase di *mantenimento* è consigliato il protocollo LMP (Cloranbucil, Metotrexato, Prednisone). I vantaggi sono legati al costo minore, alla facilità della somministrazione (somministrazione *per os*), alla tossicità molto bassa e al fatto che il medico veterinario non ha bisogno di tenere sotto stretto controllo l'animale nel corso della terapia. La maggior parte degli animali trattati con questo protocollo è mantenuta in remissione per circa 3–6 mesi; nel momento in cui compare la ricaduta, tra i protocolli consigliati per la *reinduzione della remissione* troviamo il D-MAC (Desametasone, Melfalan, Citosina Arabinoside, Actinomicina D): si tratta di un protocollo poco tossico se paragonato a quelli che contengono Doxorubicina; altro vantaggio è che il controllo da parte del veterinario viene effettuato una volta ogni due settimane invece che una volta a settimana [57] (vedi tab. 1.9).

Nome	Farmaco	Dosaggio	Schema
°LMP	Cloranbucil	20 mg/m ² PO	ogni 2 sett.
	Metotrexato	2.5 mg/m ² PO	2–3 vv./sett.
	Prednisone	20 mg/m ² PO	a gg alterni
°°D-MAC	Desametasone	0.23 mg/kg PO o SC	giorni 1 e 8
	Actinomicina D	0.75 mg/m ² IV in bolo	al giorno 1
	Citosina Arabinoside	200–300 mg/m ² IV* o SC	al giorno 1
	Melfalan	20 mg/m ² PO	al giorno 8**

Tabella 1.9: **Protocolli chemioterapici consigliati per il mantenimento° e la reinduzione della remissione°° nel linfoma nel cane.** *Infusione lenta in 4 ore; **dopo 4 dosi, sostituire il Melfalan con Cloranbucil (20 mg/m² PO ogni 2 sett.).

Oltre alla chemioterapia, sono state studiate per il controllo del linfoma altre forme terapeutiche, di cui alcune ancora in via di sperimentazione.

Sono stati usati diversi tipi di *immunoterapia*, da soli o in combinazione con la chemioterapia, ma i risultati sono stati discordanti. Tentativi di immunomodulazione con levamisolo non hanno sortito gli effetti sperati [45]; al contrario l'utilizzazione di vaccini di cellule tumorali in adiuvante completo di Freund in combinazione con la chemioterapia ha prodotto un aumento del

tempo di sopravvivenza [80]. L'utilizzo di un vaccino di cellule tumorali autologhe somministrato per via intralinfatica come protocollo di mantenimento ha consentito di ottenere tempi di remissione più lunghi e migliore qualità della vita del paziente [38]. Nuove prospettive forse potranno sorgere in seguito alla vaccinazione con antigeni overespressi dalle cellule neoplastiche inoculati con tecniche particolari (c.p. Lubas).

Vista la natura sistemica del linfoma canino, la radioterapia trova un impiego limitato come modalità terapeutica primaria, ma può essere impiegata su singoli linfonodi colpiti, in caso di forme extranodali o come adiuvante della chemioterapia. Può essere particolarmente utile quando il linfoma è causa di patologie da compressione meccanica. Per il linfoma multicentrico è in studio l'irradiazione a corpo intero o di metà corpo. L'irradiazione a corpo intero sembra dare migliori risultati se associata a trapianto di midollo autologo [19]; al contrario l'irradiazione di metà corpo non sembra prolungare i tempi di remissione ed inoltre il tasso di complicazioni è significativo (vomito, diarrea, soppressione midollare subacuta, polmoniti croniche) [41].

Anche il ruolo della chirurgia è piuttosto limitato. Può essere utile nel caso di linfoma al primo stadio per l'escissione di linfonodi solitari, soprattutto se responsabili di gravi disturbi per ostruzione meccanica. Nelle forme diffuse l'unica terapia chirurgica che negli anni è stata utilizzata è la splenectomia, ma l'utilità di questo trattamento è tuttora dibattuta: è in dubbio il fatto che essa possa aumentare i tempi di sopravvivenza o migliorare la risposta alla terapia e in alcuni casi è stato anche osservato un aggravamento della prognosi [6].

Abbiamo già nominato il trapianto di midollo osseo autologo: questa tecnica, associata a chemioterapia e radioterapia ha dato il più lungo tempo di remissione, ma è applicabile solo sperimentalmente ed è associata ad un'elevata mortalità [4] e a costi difficili da coprire.

Infine un rapido richiamo sulla terapia dei linfomi solitari ed extranodali.

Per quanto riguarda i linfomi solitari, se la massa è facilmente asportabile si ricorre alla chirurgia e l'animale andrebbe sottoposto a chemioterapia; se la massa è invece di difficile asportazione o se l'intervento chirurgico comporta rischi elevati, la radioterapia rappresenta la scelta terapeutica più indicata, sempre associata a chemioterapia. Occorre tener conto del fatto che nella maggior parte dei casi questi tendono a diventare delle neoplasie sistemiche, per questo è necessario eseguire dei periodici esami di controllo.

Nel linfoma del sistema nervoso centrale, se la lesione è localizzata il trattamento di scelta è la radioterapia associata a chemioterapia. Il farmaco più indicato è la citosina arabinoside, poiché è l'unico in grado di raggiungere alte concentrazioni nel CSF (*Cerebro Spinal Fluid*) con minimi effetti tossici sistemici. In uno studio Couto ed altri hanno associato chemioterapia sistemica, inoculazione intratecale di citosina arabinoside e radioterapia, ottenendo un miglioramento dei segni clinici, ma tempi brevi di remissione [16]. Le remissioni nei pazienti con linfoma del sistema nervoso centrale infatti, anche se facili da ottenere, sono di breve durata rispetto a quelle conseguite nei pazienti affetti da linfoma localizzato altrove.

Nel linfoma alimentare, in caso di forme solitarie a carico della parete intestinale o dei linfonodi endoaddominali si può ricorrere, come detto, all'escissione chirurgica combinata con un breve trattamento chemioterapico. In caso di linfoma intestinale diffuso, invece, la risposta alla chemioterapia sembra essere piuttosto scarsa e i tempi di sopravvivenza sono sempre piuttosto brevi [17].

Nel linfoma cutaneo il trattamento dipende dalla forma in cui si presenta la malattia. Se è secondario a una forma multicentrica si ricorre ad un protocollo chemioterapico standard; se si tratta di una forma primaria a localizzazioni isolate, chirurgia e radioterapia sono i trattamenti di scelta, ma in caso di linfoma cutaneo diffuso si deve ricorrere ad un protocollo terapeutico che contenga anche doxorubicina: la risposta iniziale può essere

buona, ma i tempi di sopravvivenza sono comunque sempre piuttosto brevi. Per trattare questa forma sono stati utilizzati anche i retinoidi con qualche risultato positivo [81].

PARTE SPERIMENTALE

INTRODUZIONE

Per confermare il sospetto diagnostico di linfoma insorto a seguito della raccolta dei dati anamnestici e clinici, la tappa obbligata è rappresentata dall'esame citologico di un campione di linfonodo ottenuto mediante aspirazione o infissione con ago sottile e soltanto in un secondo momento ricorrere, se necessario, all'esame istologico. Il ricorso inoltre ad un esteso pannello di analisi comprendente emogramma, esame del midollo, profilo biochimico, esame delle urine, profilo coagulativo, sieroelettroforesi, esami parassitologici, diagnostica per immagini e, se possibile immunofenotipizzazione, consente al clinico di emettere un corretto giudizio prognostico ed impostare un adeguato protocollo terapeutico. Questi esami, infatti, anche se non essenziali per la diagnosi di linfoma, possono rivelarsi estremamente utili per l'inquadramento del soggetto in termini clinici e per la stadiazione della malattia.

Attraverso l'attenta valutazione delle cartelle cliniche e dei risultati delle suddette analisi di 120 cani malati di linfoma, visitati nell'arco di otto anni, questa tesi si propone di mettere in evidenza le principali alterazioni di carattere clinico e di laboratorio della malattia, valutandone, se possibile, l'importanza a fini prognostici.

In tutti i casi esaminati la diagnosi si è basata sull'esame citologico e non istologico del campione: questo perchè la citopunzione linfonodale è un'operazione assai semplice, poco onerosa e più facile da accettare per il proprietario rispetto all'escissione chirurgica, necessaria invece per l'esame istologico.

L'ostacolo principale per questo lavoro di revisione è stato l'aver riscontrato che non sempre era stato applicato un identico protocollo diagnostico (data anche l'ampiezza dell'intervallo di tempo considerato) e questo ha comportato una certa disomogeneità nei dati a nostra disposizione. In particolare è emerso uno scarso ricorso alle tecniche di diagnostica per immagini e di immunofenotipizzazione, come esami complementari agli altri.

I dati considerati sono stati soltanto quelli ricavati dalla prima visita effettuata presso il Dipartimento di Clinica Veterinaria: per la maggior parte dei soggetti, infatti, queste erano le uniche informazioni che avevamo a disposizione e, trattandosi di visite di referenza, non si ha avuto modo di seguire da vicino il *follow up* di tutti. Questo è stato possibile soltanto per 16 soggetti, rimasti in cura presso il Dipartimento: in questo caso è stato possibile valutare meglio quanto emerso dalla prima visita, nonché il protocollo terapeutico impostato e gli eventuali effetti collaterali (soprattutto gastroenterici e midollari) in funzione della remissione, della ricaduta e della sopravvivenza.

Capitolo 2

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto su 120 cani malati di linfoma, pervenuti presso il Dipartimento di Clinica Veterinaria dell'Università degli Studi di Pisa negli anni 1999–2006. Ogni soggetto è stato valutato sulla base delle informazioni anamnestiche, di un'accurata visita clinica e di un pannello di analisi comprendente:

- emogramma completo;
- profilo biochimico;
- analisi delle urine;
- profilo coagulativo;
- elettroforesi delle proteine sieriche;
- agoinfissione linfonodale;
- agoaspirato midollare;
- immunofenotipizzazione;
- immunofluorescenza indiretta per *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia rickettsii*.

Per una parte dei pazienti alcuni accertamenti non sono stati eseguiti e il dettaglio della consistenza degli esami di laboratorio verrà riportato di seguito. In alcuni casi i dati clinici sono stati integrati con il ricorso alla diagnostica per immagini: ecografie addominali e radiografie toraciche.

Le informazioni ottenute per tutti i soggetti in studio si riferiscono alla prima visita effettuata presso la clinica, mentre per un ristretto numero di casi (16), dopo aver impostato un piano terapeutico, è stato possibile seguire da vicino l'intero evolversi della malattia, fino all'*exitus* del soggetto.

2.1 Emogramma

L'emogramma è stato eseguito da sangue preferibilmente collezionato dalla vena giugulare, o in alternativa dalla cefalica dell'avambraccio, e posto in una provetta contenente K3-EDTA. Per questa analisi sono stati impiegati i contaglobuli ad impedenza elettrica "*Genius Vet*" (dal 1999 al 2004) e "*He-Co Vet*" (in seguito), entrambi della ditta SEAC (Calenzano, FI, Italia), che, dopo apposita diluizione del sangue in soluzione isotonica, sono in grado di fornire i seguenti parametri:

- RBC: n° Eritrociti ($\times 10^{12}/L$);
- WBC: n° Leucociti ($\times 10^9/L$);
- Hgb: Emoglobina in g/dL ;
- Hct: Ematocrito in %;
- MCV: Volume Corpuscolare Medio in fL ;
- MCH: Emoglobina Corpuscolare Media in pg ;
- MCHC: Concentrazione Emoglobinica Corpuscolare Media in g/dL ;
- PLT: n° Piastrine ($\times 10^9/L$);

- MPV: Volume Piastrinico Medio in fL ;
- Pct: Piastrinocrito in %;
- RDW: Ampiezza di distribuzione eritrocitaria in %;
- PDW: Ampiezza di distribuzione piastrinica in %.

Inoltre tale strumento fornisce gli istogrammi delle tre popolazioni ematiche (eritrociti, leucociti, piastrine), visualizzando la distribuzione delle cellule in base al loro volume (asse x) e numero (asse y).

E' stato poi allestito un vetrino strisciato con sangue prelevato dalla provetta contenente K3-EDTA e colorato con metodo Diff-Quik®, al fine di eseguire l'analisi morfologica delle tre popolazioni cellulari (eritrociti, leucociti, piastrine) per verificare eventuali variazioni di volume, forma, colore, rapporto nucleo/citoplasma (ove presente), presenza di cellule anomale, rotte, immature (blasti) e reattive, valutazione della stima piastrinica. E' stata inoltre eseguita la conta leucocitaria differenziale che ha permesso di calcolare il numero, in valore assoluto, di neutrofili, eosinofili, basofili, linfociti e monociti.

La gravità delle anemie è stata classificata in base all'ematocrito in: *leggera* (Hct: 30-37 %), *moderata* (Hct: 20-29 %), *grave* (Hct: 13-10 %), *gravissima* (Hct: inferiore a 13 %). Per tutti i soggetti con valori di ematocrito inferiore a 30% sono stati inoltre allestiti vetrini strisciati con il colorante Nuovo Blu di Metilene e sono stati calcolati il conteggio reticolocitario parziale (%) e assoluto ($\times 10^9/L$), la Correzione della Percentuale dei Reticolociti (CPR) e l'Indice di Produzione Reticolocitaria (RPI). I valori di RPI inferiori ad 1 sono stati considerati indicativi di anemia *non rigenerativa*, mentre i valori superiori a 2 indicativi di anemia *rigenarativa*.

2.2 Profilo biochimico e analisi delle urine

Il profilo biochimico è stato effettuato dallo stesso prelievo utilizzato per l'emogramma, ma ponendo il sangue in provetta senza anticoagulante, al fine di ricavarne il siero dopo centrifugazione a 2700 rpm/min per 10 minuti. Per l'esecuzione dell'analisi è stato utilizzato lo strumento "*Slim*" della ditta SEAC (Radim Company, Calenzano, FI, Italia) a chimica liquida, che ha permesso la determinazione dei seguenti analiti: proteine totali, albumina, urea, creatinina, ALT, AST, AP, GGT, calcio, fosforo, ferro, colesterolo, glicemia. I reagenti usati sono quelli forniti dalla ditta stessa.

L'analisi delle urine è stata eseguita con lo strumento "*MicroAution MA-4260*" (A. Menarini diagnostics, FI, Italia); le strisce utilizzate sono state del tipo "*Aution 10 EA*" (A. Menarini diagnostics, FI, Italia).

2.3 Profilo coagulativo

Quest'analisi è stata eseguita attraverso lo strumento "*Clot 2S*" della ditta SEAC (Calenzano, FI, Italia) ed ha compreso la determinazione del *tempo di protrombina* (PT), *tempo di tromboplastina parziale attivata* (APTT) e del *fibrinogeno*. I reagenti usati sono quelli forniti dalla ditta stessa.

2.4 Elettroforesi

L'elettroforesi delle proteine del siero è stata condotta su Acetato di cellulosa (*Microtech 648 R*, Interlab, Roma, Italia).

2.5 Agoinfissione linfonodale

Il prelievo è stato eseguito sui linfonodi interessati da megalia: nei casi di linfadenopatia sistemica si è preferito effettuare il campionamento sui linfonodi prescapolari o poplitei, evitando i sottomandibolari e perifaringei¹.

¹ Poichè drenano dalle prime vie del tratto digerente e respiratorio questi linfonodi sono frequentemente interessati da processi flogistici aspecifici.

Dopo tricotomia (eventuale) e disinfezione della parte interessata, il linfonodo viene stabilizzato con una mano, mentre con l'altra si inserisce un ago (senza siringa) da 18-21 G nel tessuto e lo si fa penetrare più volte in diverse direzioni e profondità (il materiale risale per capillarità, se fluido, oppure si colloca all'interno del cilindro dell'ago). A questo punto si ritira l'ago dalla massa, si aspira aria con lo stantuffo di una siringa da 5 ml, si connette l'ago alla siringa e si espelle il materiale prelevato su dei vetrini portaoggetti molati con banda smerigliata. I vetrini così ottenuti sono stati strisciati per apposizione parallela, due per volta uno sull'altro, quindi colorati con l'impiego di coloranti rapidi di tipo Diff Quik® e osservati al microscopio ottico, inizialmente a ridotto ingrandimento (obiettivo 20x), poi a maggiore ingrandimento (obiettivo 40x) ed infine tramite obiettivo ad immersione (100x). I linfomi sono stati classificati dal punto di vista citologico sulla base della Kiel Updated.

2.6 Agoaspirato midollare

L'agoaspirato midollare è stato eseguito preferibilmente dalla cresta iliaca, in alternativa dallo sterno, tramite un ago midollare munito di mandrino, di tipo Illinois. Dopo tricotomia nella regione anatomica scelta, si disinfetta e si infiltra con anestetico locale (1 ml di lidocaina), quindi l'ago viene infisso mantenendo il mandrino in sede. Quando la punta dell'ago tocca la corticale dell'osso, si effettuano lenti movimenti rotatori sul piano verticale, fino a che questa non inizia a penetrare l'osso e si continua con movimenti più vigorosi, fino a che l'ago non risulta saldamente infisso nell'osso. A questo punto si rimuove lo stiletto centrale e si raccorda l'ago a una siringa da 10 ml, si retrae lo stantuffo e si aspira: il materiale midollare così ottenuto viene espulso su dei vetrini portaoggetto con banda smerigliata, fatti poi scivolare per apposizione parallela. Gli strisci così ottenuti sono stati poi colorati e letti con la stessa metodica descritta per l'agoinfissione linfonodale. In 61 casi l'esame

del midollo è stato completato anche dalla valutazione degli indici midollari: M/E (rapporto mieloide/eritroide), EMI (indice di maturazione eritrocitaria), I/Me (indice di eritropoiesi), MMI (indice di maturazione mieloide), I/Mg (indice di granulocitopoiesi), I/M (indice di mielopoiesi).

2.7 Immunofenotipizzazione

Quest'analisi è stata effettuata a partire dal 2003 e solo su 22 casi in totale. Parte del materiale aspirato dal midollo o dal linfonodo è stato sospeso in 1 ml di PBS (*phosphate buffered saline solution*) tenuto a 4°C e le provette sono state inviate presso il Laboratorio d'analisi della Clinica Veterinaria Privata "San Marco" di Padova per l'esecuzione dell'analisi. Gli anticorpi utilizzati sono stati: per i linfociti B anticorpi anti CD21 e anti CD79 (panB), per i linfociti T anticorpi anti CD3, anti CD4 e anti CD8.

2.8 Analisi parassitologiche

Le analisi parassitologiche, su siero, per *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia rickettsii* sono state eseguite presso il Dipartimento di Patologia Animale (sezione di Parassitologia) con la tecnica dell'Immunofluorescenza Indiretta (IFI), al fine di verificare la presenza di anticorpi.

2.9 Analisi statistica

Per il totale dei soggetti in studio (120) è stata condotta un'analisi descrittiva della malattia, comprendente tutte le caratteristiche, cliniche e di laboratorio, riscontrate alla prima visita.

Per i 16 soggetti di cui si ha il follow up completo, è stata condotta l'analisi descrittiva del campione in esame e delle principali caratteristiche

di sopravvivenza riscontrate: *tasso di risposta*², *tasso di risposta completa*³, tempo di raggiungimento della *remissione completa*⁴, durata della remissione completa e tempo di comparsa della *ricaduta* (o *recidiva*⁵), periodo di *sopravvivenza*⁶. Tutti gli intervalli di tempo sono espressi in settimane. In questo stesso gruppo è stata inoltre condotta un'analisi di statistica inferenziale volta ad identificare i fattori associati a tali caratteristiche di sopravvivenza. Le variabili relative al segnalamento (età, sesso), all'anamnesi (pretrattamento con cortisone, momento di comparsa dei sintomi), alla malattia (stadio clinico, substadio, grado di malignità secondo la classificazione di Kiel, fenotipo), i reperti di laboratorio riscontrati alla prima visita (anemia, trombocitopenia, linfopenia, infiammazione, presenza di blasti in circolo o nel midollo osseo, presenza di danno epatico, presenza di danno renale) e le variabili relative alla chemioterapia (protocollo d'induzione impostato, tossicità della chemioterapia) sono state valutate mediante il Test del χ^2 per verificarne l'associazione con il tasso di risposta completo. Mediante la curva di Kaplan-Meier queste stesse variabili sono state analizzate in funzione del raggiungimento di un determinato *endpoint*: remissione completa, ricaduta e sopravvivenza. Le diverse curve di sopravvivenza ottenute sono state comparate mediante il log-rank test (χ^2) per valutarne l'associazione con la remissione completa, la ricaduta e la sopravvivenza. I valori di $P < 0.05$ sono stati considerati significativi.

²*Tasso di risposta*: percentuale di cani che hanno raggiunto una remissione completa o parziale (se persiste sempre un certo grado di linfadenomegalia) a seguito del protocollo terapeutico impostato.

³*Tasso di risposta completa*: percentuale di cani che hanno raggiunto la remissione completa a seguito del protocollo terapeutico impostato.

⁴*Remissione completa*: completa scomparsa della linfadenomegalia. L'intervallo di tempo è calcolato a partire dall'inizio della chemioterapia.

⁵*Ricaduta* (o *recidiva*): ricomparsa di un ingrossamento linfonodale dopo la remissione completa. L'intervallo di tempo è calcolato a partire dall'inizio della chemioterapia.

⁶*Sopravvivenza*: intervallo di tempo compreso tra l'inizio della chemioterapia e la data di morte dell'animale o l'ultima data in cui si era a conoscenza che l'animale fosse ancora vivo.

Capitolo 3

RISULTATI

3.1 Premessa

Ai fini di una corretta valutazione di tutte le informazioni ottenute dalla visita clinica e dall'esecuzione dell'analisi di laboratorio è importante considerare due fattori che sono emersi dall'anamnesi: il tempo di insorgenza della sintomatologia rispetto al momento in cui i cani sono stati portati presso la nostra struttura e l'eventuale trattamento cortisonico effettuato prima ancora di emettere la diagnosi di linfoma.

Per quanto riguarda il momento di comparsa dei sintomi, questo dato era specificato solo per 103 soggetti. Tra questi, come si può vedere nella tabella 3.1, soltanto il 5.8% (6/103) è stato portato da noi entro la settimana in cui si sono presentati i primi sintomi, mentre per la maggior parte sono stati portati dopo un periodo di 1–2 settimane e 3–4 settimane, in misura minore dopo 5–8 settimane e una piccola parte dopo un periodo superiore o uguale alle 12 settimane (in particolare: 1 soggetto dopo 3 mesi, 4 soggetti dopo 4 mesi, 4 soggetti dopo 5 mesi dall'inizio dei sintomi).

Dall'anamnesi si apprende inoltre che un consistente numero di soggetti (44.2%: 53/120) era stato sottoposto a un trattamento con corticosteroidi nel periodo precedente alla visita (vedi tab. 3.2). La tabella 3.3 mostra come è variato il ricorso a tale pratica col passare del tempo: come si può notare, mentre nei primi anni (1999–2003) abbiamo una situazione piuttosto

variabile (dal 12.5% al 70%), negli ultimi tre anni (2004–2006) questa pratica è stata riscontrata costantemente in circa la metà dei cani esaminati.

INIZIO SINTOMI		
Settimane	n. casi	%
< 1	6	5.8
1–2	36	35
3–4	31	30.1
5–8	21	20.4
≥ 12	9	8.7

Tabella 3.1: **Tempo di insorgenza dei sintomi clinici rispetto alla prima visita (103 casi).**

CORTISONE	n. casi	%
Sì	53	44.2
No	67	55.8

Tabella 3.2: **Cani trattati con cortisone nel periodo immediatamente precedente la diagnosi di linfoma.**

CORTISONE		
Anno	n. casi	%
1999	4/16	25
2000	9/16	56.3
2001	1/8	12.5
2002	7/10	70
2003	2/11	18.2
2004	11/20	55
2005	10/23	43.5
2006	9/16	56.3

Tabella 3.3: **Frequenza di trattamento con cortisone dei cani con linfoma negli anni 1999–2006.**

3.2 Segnalamento

La casistica di questo studio si compone di 120 soggetti, di cui il 55.8% maschi (67/120: 63 interi e 4 castrati) e il 44.2% femmine (53/120: 35 intere

e 18 sterilizzate).

Il 60% (72/120) dei cani considerati è raggruppabile in 5 razze maggiormente rappresentate: meticci (24%: 29/120), Pastore Tedesco (14%: 17/120), Boxer (8%: 10/120), Dobermann (8%: 10/120), Rottweiler (5%: 6/120). L'elenco completo delle razze interessate è illustrato nella tabella 3.4.

RAZZE	n. casi	%
Meticcio	29	24
P. Tedesco	17	14
Dobermann	10	8
Boxer	10	8
Rottweiler	6	5
Alano	5	4
Bullmastiff	5	4
Setter Inglese	5	4
Labrador	3	3
Fox terrier	3	3
Lagotto	2	2
Altre*	25	21

Tabella 3.4: **Razze canine colpite da linfoma (120 casi).** *Altre (1 caso per razza): Bracco ted., P. Belga, Collie, Corgi, Schnautzer, Shar Pei, Dogue de Bordeaux, Bulldog, Corso, Terranova, Bovaro del bernese, Scottish Terrier, Bull Terrier, Pit bull, Siberian Husky, Segugio, Bracco italiano, Breton, Setter Irlandese, Springer Spaniel, Cocker spaniel, Shih Tzu, Levriero Whippet, Levriero russo, Levriero italiano.

Per quanto riguarda l'età il range riscontrato è compreso tra 1.8 e 15 anni (età media 7.5 anni, mediana 7.15 anni). Il 64.2% (77/120) dei soggetti presentava un'età compresa tra i 4 e i 9 anni nel momento in cui è stata fatta la diagnosi di linfoma, equamente distribuiti in due "fasce d'età": 4–6 anni e 7–9 anni (vedi tab. 3.5).

Il 95% (114/120) dei soggetti considerati proviene dalla regione Toscana, per la maggior parte dalle provincie di Pisa, Livorno, Firenze e Lucca (in percentuali minori dalle provincie di Massa, Prato, Pistoia, Siena e Grosseto). Il restante 5% (6/120) proviene dalle provincie di La Spezia, Ferrara e Bologna (vedi tab. 3.6).

ETA'		
Anni	n. casi	%
0-3	8	6.7
4-6	38	31.7
7-9	39	32.5
10-12	28	23.3
13-15	7	5.8

Tabella 3.5: Età alla diagnosi di linfoma (120 casi).

PROVINCIA	n. casi	%
Pisa	39	32.5
Livorno	20	16.7
Firenze	18	15
Lucca	16	13.3
Massa	5	4.2
Prato	5	4.2
Pistoia	4	3.3
Siena	4	3.3
La Spezia	4	3.3
Grosseto	3	2.5
Bologna	1	0.8
Ferrara	1	0.8

Tabella 3.6: Province di provenienza di 120 cani con linfoma.

Per quanto riguarda l'anamnesi ambientale, questo dato era specificato per 88 soggetti su 120. Di questi il 38.6% (34/88) viveva in un ambiente urbano, il 33% (29/88) suburbano e il 28.4% (25/88) rurale.

3.3 Classificazione

Lo stadio clinico della malattia più frequentemente riscontrato è stato il V (coinvolgimento di sangue e/o midollo osseo, 45%: 54/120), poi nell'ordine il IV (coinvolgimento di fegato e/o milza, 29.2%: 35/120), il III (coinvolgimento linfonodale generalizzato, 23.3%: 28/120) e il II (coinvolgimento dei linfonodi di una regione, 2.5%: 3/120). Nessun caso si è presentato con la malattia allo stadio I (coinvolgimento di un singolo linfonodo) (vedi tab. 3.7).

STADIO	n. casi	%
II	3	2.5
III	28	23.3
IV	35	29.2
V	54	45

Tabella 3.7: **Stadi clinici di linfoma riscontrati in 120 cani.**

Per quanto riguarda il tipo anatomico la forma multicentrica è risultata essere la più rappresentata, interessando il 95% (114/120) dei soggetti, mentre le forme alimentare, mediastinica e cutanea si sono presentate in egual misura, ciascuna nell'1.67% (2/120) dei casi (vedi tab. 3.8). Nel caso delle forme cutanee si trattava in un soggetto di linfoma cutaneo non epiteliotropo a probabile fenotipo T, nell'altro di linfoma cutaneo epiteliotropo¹ a fenotipo T².

Per quanto riguarda la classificazione citologica delle forme multicentriche, si è riscontrata una netta prevalenza delle forme ad alto grado di malignità (82.5%: 94/114), rispetto a quelle a basso grado (14.9%: 17/114). In tre

¹Accertato con l'esame istologico della cute.

²Accertato con l'immunofenotipizzazione.

TIPO ANATOMICO	n. casi	%
Multicentrico	114	95
Alimentare	2	1.7
Mediastinico	2	1.7
Cutaneo	2	1.7

Tabella 3.8: **Tipi anatomici di linfoma riscontrati in 120 cani.**

soggetti (2.6%: 3/114) la classificazione citologica è stata impossibile a causa delle forti alterazioni cellulari, attribuibili al precedente trattamento con cortisonici. All'interno delle forme ad alto grado di malignità il linfoma più rappresentato è stato il tipo *centroblastico polimorfo*, seguito dal *linfoblastico*, *immunoblastico* e *pleomorfo* (questi ultimi due presenti in egual misura) e da altre forme in percentuali minori; tra le forme a basso grado di malignità prevale il *centrocitico-centroblastico*, seguito poi dal *linfoplasmocitico* (vedi tab. 3.9).

Malignità	Tipo citologico	n. casi	%
Bassa	centrocitico centroblastico	7	6.1
	linfoplasmocitico	5	4.4
	a cell medie macronucleolate	3	2.6
	a piccole cellule	2	1.8
Alta	centroblastico polimorfo	63	55.3
	linfoblastico	11	9.6
	immunoblastico	7	6.1
	pleomorfo	7	6.1
	centroblastico immunoblastico	4	3.5
	centroblastico monomorfo	1	0.9
	anaplastico (indifferenziato)	1	0.9
?	inclassificabile	3	2.6

Tabella 3.9: **Classificazione citologica dei linfomi di tipo multicentrico (114 casi).**

Per quanto riguarda l'immunofenotipizzazione, come detto, è stata eseguita solo su 22 casi. All'interno di questo gruppo ristretto, il tipo cellulare prevalente è stato il B, con una percentuale del 68.2% (15/22), rispetto al

31.8% (7/22) del tipo cellulare T.

3.4 Sintomi clinici

Per questa sezione distinguiamo tra le informazioni ottenute con l'anamnesi e quelle ricavate dall'esame clinico. Riportiamo inoltre separatamente i dati riguardanti le diverse forme di linfoma (multicentrico, alimentare, mediastinico e cutaneo).

3.4.1 Anamnesi

Linfoma multicentrico

L'elenco completo della sintomatologia riferita dai proprietari è riportato nella tabella 3.10.

MULTICENTRICO		
Anamnesi	n. casi	%
LNM generalizzata	72	63.2
Disoressia/anoressia	34	29.8
LNM localizzata	30	26.3
Dimagrimento	17	14.9
Poliuria-Polidipsia	15	13.2
Abbattimento	14	12.3
Dispnea	11	9.6
Edema	11	9.6
Vomito	10	8.8
Diarrea	9	7.9
Emorragie	7	6.1
Febbre	5	4.4
Debolezza muscolare	3	2.6
Tonsillite	2	1.8
Stipsi	1	0.9
Disfagia	1	0.9

Tabella 3.10: Incidenza dei sintomi riferiti all'anamnesi nel linfoma multicentrico (114 casi).

Come si può osservare, tra i sintomi più rappresentati abbiamo (in ordine di frequenza) linfadenomegalia generalizzata, disoressia-anoressia, linfoade-

nomegalia localizzata, dimagrimento, poliuria/polidipsia (di questi il 40%, 6/15, era in terapia con cortisone), abbattimento, dispnea, edemi, vomito, diarrea, emorragie ed altri in percentuali minori. Per quanto riguarda la linfadenomegalia localizzata i linfonodi interessati erano i sottomandibolari (76.67%: 23/30), i poplitei (13.33%: 4/30), i retrofaringei (6.67%: 2/30) ed infine i prescapolari (3.33%: 1/30). Per quanto riguarda l'edema, questo era localizzato al muso (18.18%: 2/11), nell'area sottomandibolare (18.18%: 2/11), su testa e collo (18.18%: 2/11), agli arti posteriori (18.18%: 2/11), ai genitali (scroto, prepuzio) (18.18%: 2/11) ed infine sui genitali e agli arti posteriori insieme (9.09%: 1/11). Per quanto riguarda le emorragie, gli episodi riferiti sono stati: ematochezia (42.86%: 3/7), ematuria (28.57%: 2/7), epistassi (14.29%: 1/7), epistassi ed ematochezia insieme (14.29%: 1/7).

Linfoma alimentare

Un soggetto ha presentato esclusivamente vomito e diarrea; per l'altro soggetto sono stati segnalati invece anoressia, feci scarse e scure, poliuria-polidipsia, debolezza muscolare.

Linfoma mediastinico

Per un soggetto è segnalata dispnea anche a riposo, mentre per entrambi è riportato come sintomo principale il facile affaticamento.

Linfoma cutaneo

Per un soggetto sono riportati noduli sottocutanei diffusi, mentre per l'altro è segnalato dimagrimento e presenza di chiazze eritematose localizzate a livello di muso e mucosa palatina.

3.4.2 Esame clinico

Linfoma multicentrico

L'elenco dei rilievi riscontrati all'esame clinico (con le relative incidenze) è riportato nella tabella 3.11.

Anche in questo caso la linfadenomegalia generalizzata è il sintomo riscontrato con maggior frequenza (superiore rispetto a quanto riportato nell'anamnesi), mentre la linfadenomegalia localizzata è stata riscontrata solo nel 3.5% (4/114) dei casi, con interessamento dei linfonodi prescapolari (50%: 2/4), sottomandibolari (25%: 1/4) e retrofaringei (25%: 1/4). Altro rilievo di frequente riscontro è stata la splenomegalia (52.6%: 60/114, ma in un caso era dovuta ad emangiosarcoma³), mentre l'epatomegalia è stata riscontrata in misura minore (19.3%: 22/114). Per quanto riguarda le alterazioni oculari (19.3%: 22/114) si trattava di scolo oculocongiuntivale (27.3%: 6/22), congiuntivite (22.7%: 5/22), cheratite (13.6%: 3/22), uveite (9.1%: 2/22), ifema (9.1%: 2/22), cataratta (9.1%: 2/22), esoftalmo (4.5%: 1/22), asimmetria pupillare (4.5%: 1/22). Nel caso invece delle alterazioni cutanee (17,5%: 20/114), consistevano in presenza di forfora (45%: 9/20), noduli cutanei (25%: 5/20; di questi soltanto in un caso si trattava di una massa linfoide per probabile localizzazione secondaria del tumore a livello cutaneo), neoformazioni sottocutanee (10%: 2/20), dermatite (10%: 2/20), onicogrifosi (5%: 1/20; soggetto affetto da leishmaniosi), alopecia endocrina (5%: 1/20; soggetto affetto da ipotiroidismo). Per quanto riguarda l'edema (8.8%: 10/114) il dato è simile a quello riportato nell'anamnesi ed anche le zone interessate coincidono sostanzialmente: genitali (scroto, prepuzio) (30%: 3/10), muso e petto (20%: 2/10), arti (20%: 2/10), area sottomandibolare (10%: 1/10), genitali e petto (10%: 1/10), testa e collo (10%: 1/10).

In 14 soggetti è stata effettuata ecografia addominale. In questo gruppo

³La presenza di emangiosarcoma è stata confermata dall'esame istologico eseguito dopo l'intervento di splenectomia.

MULTICENTRICO		
Esame clinico	n. casi	%
LNM generalizzata	110	96.5
Splenomegalia	60	52.6
Febbre	33	28.9
Dimagrimento	31	27.2
Alterazioni oculari	22	19.3
Tachipnea/polipnea	22	19.3
Epatomegalia	20	17.5
Pallore delle mucose	19	16.7
Depressione del sensorio	17	14.9
Soffio cardiaco	15	13.2
Edema	10	8.8
Tachicardia	9	7.9
Disidratazione	8	7
Ipotrofia/Atrofia muscolare	7	6.1
Stato di Nutrizione scadente	6	5.3
Dispnea	5	4.4
Murmure respiratorio rinforzato	5	4.4
LNM localizzata	4	3.5
Sovrappeso	3	2.6
Petecchie cute/mucose	3	2.6
Interessamento tonsillare	3	2.6
Aumento volume addome	3	2.6
Noduli mammari	3	2.6
Dolorabilità palpazione addome	2	1.8
Addome teso	2	1.8
Prostatomegalia	2	1.8
Mucose congeste	1	0.9
Ittero	1	0.9
Ipotermia	1	0.9

Tabella 3.11: Incidenza dei sintomi riscontrati all'esame clinico nel linfoma multicentrico (114 casi).

la splenomegalia è stata riscontrata nel 64.3% (9/14) dei casi, l'epatomegalia nel 21.4% (3/14), mentre per quanto riguarda i linfonodi addominali abbiamo interessamento dei lomboaortici nel 28.6% (4/14), degli iliaci nel 28.6% (4/14), dei portali nel 14.3% (2/14), degli inguinali nel 14.3% (2/14) e dei sottolombari nel 7.1% (1/14).

In 5 soggetti sono state eseguite radiografie al torace e tra questi l'interessamento dei linfonodi mediastinici è stato rilevato nell'80% (4/5) dei casi. Altri reperti sono stati: ispessimento della trama bronchiale (60%: 3/5), ispessimento della trama interstiziale (40%: 2/5) ed ispessimento della trama vascolare (20%: 1/5).

Linfoma alimentare

In un soggetto è stato riscontrato dimagrimento e raccolta di liquido ascitico in addome; in un altro si è riscontrato presenza di una neoformazione a localizzazione intestinale alla palpazione addominale (confermata poi dal riscontro ecografico), tachipnea, pallore delle mucose e soffio sistolico all'auscultazione cardiaca. Entrambi presentavano depressione del sensorio.

Linfoma mediastinico

In un soggetto è stato riscontrato itto cardiaco spostato a destra, toni cardiaci affievoliti, murmure vescicolare rinforzato, respiro discordante, limiti polmonari spostati caudalmente, ipofonesi delle zone ventrali e iperfonesi delle zone dorsali del torace; la radiografia del torace ha messo in evidenza la presenza di versamento pleurico. Nell'altro soggetto si è riscontrato dimagrimento, depressione del sensorio, febbre, tachicardia e la radiografia del torace ha messo in evidenza interessamento dei linfonodi mediastinici.

Linfoma cutaneo

In un soggetto è stata confermata la presenza dei noduli sottocutanei diffusi ed è stata riscontrata linfadenomegalia generalizzata. Nell'altro soggetto è

stato riscontrato dimagrimento, presenza di chiazze eritematose, sopraelevate, circolari e ulcerate, localizzate a livello mandibolare e sul palato, ptialismo e linfadenomegalia del linfonodo sottomandibolare sinistro.

3.5 Emogramma

L'analisi dell'emogramma ha evidenziato la presenza di anemia nel 48.3% (58/120) dei casi. In base all'ematocrito queste anemie erano *leggere* nel 62.1% (36/58) dei casi, *moderate* nel 31% (18/58) e *gravi* nel 6.9% (4/58) (vedi tab. 3.12).

ANEMIA		
Gravità	n. casi	%
Leggera	36	62.1
Moderata	18	31
Grave	4	6.9

Tabella 3.12: **Gravità delle anemie in corso di linfoma (58 casi).**

Per le anemie moderate e gravi (22 casi in tutto) si è visto che nella maggioranza dei casi queste erano non rigenerative (15 casi) o scarsamente rigenerative (2 casi) (vedi tab. 3.13).

ANEMIA		
Rigenerazione	n. casi	%
Presente	5	22.7
Scarsa	2	9.1
Assente	15	68.2

Tabella 3.13: **Rigenerazione nelle anemie moderate e gravi in corso di linfoma (22 casi).**

Come si vede dalla tabella 3.14, valutando gli indici eritrocitari si è potuto osservare che nella maggioranza dei casi (81%: 47/58) si trattava di un'anemia normocitica–normocromica; il soggetto con anemia microcitica–ipocromica era colpito dalla forma alimentare.

ANEMIA			
Indici eritrocitari		n. casi	%
Normocitica	Normocromica	47	81
Normocitica	Ipocromica	1	1.7
Normocitica	Ipercromica	4	6.9
Microcitica	Normocromica	4	6.9
Microcitica	Ipocromica	1	1.7
Macrocitica	Normocromica	1	1.7

Tabella 3.14: **Tipologie di anemie in base agli indici eritrocitari in corso di linfoma (58 casi).**

Per quanto riguarda la valutazione piastrinica si è tenuto conto del numero totale di piastrine fornito dal contaglobuli, ma soprattutto della stima piastrinica effettuata mediante osservazione dello striscio ematico. In base a quest'ultima si è verificato che la presenza di piastrine era adeguata nella maggioranza dei casi (vedi tab. 3.15).

PIASTRINE		
Stima	n. casi	%
Adeguate	87	72.5
Ridotta	15	12.5
Inadeguata	16	13.3
Aumentata	2	1.7

Tabella 3.15: **Stima piastrinica in corso di linfoma (120 casi).**

L'interpretazione dei reperti leucocitari riscontrati è riassunta nella tabella 3.16, nella quale si osserva che una situazione di assoluta normalità è stata riscontrata solo nel 20.8% (25/120) dei casi.

Nei soggetti che presentavano *leucocitosi* (31.7%: 38/120), l'analisi del leucogramma ha evidenziato che in oltre la metà di questi (52.6%: 20/38) era in atto un processo infiammatorio cronico (puro in 11 casi, modificato dal concomitante effetto dei corticosteroidi in 9 casi), mentre un quadro infiammatorio acuto è stato riscontrato solo nel 5.3% (2/38) dei casi ed anche in questo caso si trattava di una forma mista, dovuta al concomitante

REPERTI LEUCOCITARI	n. casi	%
Leucogramma basale	25	20.8
Leucocitosi	38	31.7
Leucopenia	9	7.5
Altro*	48	40

Tabella 3.16: **Reperti leucocitari in corso di linfoma (120 casi).** *Altro: variazione di una o più popolazioni leucocitarie in presenza di un numero totale di WBC normale.

effetto dei corticosteroidi. Oltre che nei casi appena citati, l'effetto dei corticosteroidi è stato riscontrato anche nel 18.4% (7/38) dei casi e tra questi in particolare 4 soggetti avevano effettivamente subito un trattamento con tali farmaci prima della visita da noi. Il soggetto che ha presentato la reazione leucemoide presentava un linfoma di tipo *anaplastico*, cioè indifferenziato, ad elevato grado di malignità.

LEUCOCITOSI		
Leucogramma	n. casi	%
Infiammatorio cronico	11	28.9
Misto infiammatorio cronico-corticosteroidi	9	23.7
Corticosteroidi	7	18.4
Leucemico	7	18.4
Misto infiammatorio acuto-corticosteroidi	2	5.3
Reazione leucoeritroblastica	1	2.6
Reazione leucemoide	1	2.6

Tabella 3.17: **Leucocitosi in corso di linfoma: interpretazione dei leucogrammi (38 casi).**

La *leucopenia* è stata riscontrata nel 7.5% (9/120) dei casi; nella tabella 3.18 sono illustrate le linee cellulari interessate dalla riduzione. In questo gruppo, nel 66.7% (6/9) dei soggetti è stata riscontrata invasione blastica a livello di midollo osseo.

Infine abbiamo un cospicuo numero di soggetti (40%: 48/120) in cui sono state ritrovate variazioni in una o più popolazioni leucocitarie in assenza di

LEUCOPENIA		
Popolazioni interessate	n. casi	%
↓ Linf, ↓ Eos	2	22.2
↓ Neu, ↓ Linf, ↓ Eos	2	22.2
↓ Linf	2	22.2
↓ Neu	1	11.1
↓ Neu con deviazione a dx	1	11.1
↓ Neu, ↓ Eos	1	11.1

Tabella 3.18: **Leucopenia in corso di linfoma: linee cellulari interessate da riduzione(9 casi).**

leucocitosi o leucopenia (vedi tab. 3.19). In questo caso le alterazioni maggiormente riscontrate sono state la *linfopenia* e/o l'*eosinopenia*, testimoni di un effetto corticosteroido-indotto, trovate nel 66.7% (32/48) dei casi: tra questi soggetti, il 40.6% (13/32) era stato effettivamente sottoposto a trattamento con tali sostanze in precedenza. Nel 14.6% (7/48) dei casi si sono ritrovate alterazioni suggestive di infiammazione cronica (*neutrofilia* e/o *monocitosi*). La *linfocitosi*, riscontrata nel 16.7% (8/48) dei casi, in 6 soggetti era dovuta ad un elevato numero di blasti in circolo (linfoma leucemico), mentre in 2 soggetti era testimone di un processo infettivo in atto (in uno di questi due era stata effettivamente riscontrata positività all'*Ehrlichia canis*). Interessante è stato il riscontro della sola *eosinofilia* in un soggetto colpito da mastocitoma e linfoma contemporaneamente.

Veniamo ora all'invasione blastica del circolo periferico. Nei paragrafi precedenti sono stati già citati i casi in cui la presenza di blasti era tale da determinare una linfocitosi marcata (13 in tutto) e si è quindi parlato di linfoma leucemico, ma se si tiene conto anche di quei soggetti in cui l'entità dell'invasione era minore, questo numero sale a 33/120, che corrisponde al 27.5% del totale. Nella tabella 3.20 sono illustrati i diversi tipi di linfoma coinvolti. Come si può vedere, ad eccezione di un caso con forma cutanea, si tratta di soggetti con linfoma multicentrico, per la maggior parte ad elevato

VARIAZIONE DI POPOLAZIONI LEUCOCITARIE			
Popolazioni interessate	n. casi	%	Interpretazione
↓ Linf	13	27.1	Corticosteroidi
↓ Eos	11	22.9	Corticosteroidi
↓ Linf, ↓ Eos	5	10.4	Corticosteroidi
↑ Neu, ↓ Linf	3	6.3	Corticosteroidi
↑ Mono, ↓ Linf, ↓ Eos	1	2.1	Inflammatorio cronico-corticosteroidi
↑ Neu	3	6.3	Inflammatorio cronico
↑ Mono	3	6.3	Inflammatorio cronico
↑ Linf, ↓ Eos	1	2.1	Infezione cronica-corticosteroidi
↑ Linf, ↓ Neu	1	2.1	Infezione cronica
↑ Linf (↑ Blasti), ↓ Neu, ↓ Eos	2	4.2	Leucemico- corticosteroidi
↑ Linf (↑ Blasti)	4	8.3	Leucemico
↑ Eos	1	2.1	Mastocitoma

Tabella 3.19: **Variazioni di una o più popolazioni leucocitarie in assenza di leucocitosi o leucopenia in corso di linfoma (48 casi).**

grado di malignità, tranne due, a basso grado di malignità (il linfoma a cellule medie macronucleolate e il linfoplasmocitico).

3.6 Esame del midollo osseo

Quest'esame è stato eseguito su 95 soggetti in totale (79.2%). Nella tabella 3.21 è riportato l'elenco completo delle alterazioni midollari riscontrate. Si nota come in praticamente la metà dei soggetti esaminati (49.5%: 47/95) è presente infiltrazione da parte di cellule neoplastiche, mentre nel 28.4% (27/95) dei casi la situazione è di assoluta normalità. Nel restante 22.1% (21/95) si riscontra riduzione della sola linea eritroide (5 casi), riduzione della linea eritroide con contemporaneo aumento di quella mieloide (3 casi), aumento della sola linea mieloide (3 casi) e infiltrazioni di diverso tipo (plasmocitaria, linfocitaria, linfoplasmocitaria; 7 soggetti in tutto). Solo il 2.1% (2/95) presenta ipoplasia midollare (con riduzione cioè di tutte le linee:

BLASTI IN CIRCOLO		
Tipo di linfoma	n. casi	%
Centroblastico polimorfo	14	42.4
Linfoblastico	6	18.2
Immunoblastico	4	12.1
Pleomorfo	3	9.1
Centroblastico-Immunoblastico	1	3
Centroblastico monomorfo	1	3
Anaplastico	1	3
A cell medie macronucleolate	1	3
Linfoplasmocitico	1	3
Cutaneo	1	3

Tabella 3.20: **Blasti nel circolo ematico periferico (33 casi): linfomi coinvolti.**

mieloide, eritroide e megacariocitica).

MIDOLLO OSSEO		
Reperti	n. casi	%
Midollo NORMALE	27	28.4
Infiltrazione Neoplastica (Linfoide)	47	49.5
Ipoplasia Eritroide	5	5.3
Ipoplasia Eritroide-Iperplasia Mieloide	3	3.2
Iperplasia Mieloide	3	3.2
Iperplasia Eritroide-Ipoplasia Mieloide	1	1.1
Ipoplasia midollare	2	2.1
Infiltrazione Plasmocitaria	4	4.2
Infiltrazione Linfocitaria	2	2.1
Infiltrazione Linfoplasmocitica	1	1.1

Tabella 3.21: **Reperti midollari in corso di linfoma (95 casi).**

Oltre alla presenza di blasti, è stata riscontrata la presenza di altre cellule, di norma scarsamente rinvenibili a livello midollare, soprattutto plasmacellule, macrofagi, linfociti, in misura minore cellule danneggiate, osteoblasti e osteoclasti. L'elenco completo è riportato nella tabella 3.22.

Andando a valutare invece lo status midollare nei soggetti che presentano infiltrazione neoplastica, si vede che in oltre la metà di questi (55.3%: 26/47)

MIDOLLO OSSEO		
Altre cellule	n. casi	%
Plasmacellule	69	72.6
Macrofagi	63	66.3
Linfociti	56	59
Blasti	47	49.5
Cell danneggiate	8	8.4
Osteoblasti	7	7.4
Osteoclasti	6	6.3
Cell inclassificabili	4	4.2
Monociti	2	2.1
Cell endoteliali	1	1.1
Mast cells	1	1.1

Tabella 3.22: **Esame del midollo: cellule presenti oltre alla serie eritroide, mieloide e megacariocitica.**

la cellularità è normale, mentre nei restanti casi si ha per lo più riduzione di tutte le linee cellulari (19.2%: 9/47), della sola linea eritroide (19.2%: 9/47) o della sola linea mieloide (4.3%: 2/47) (vedi tab. 3.23). I tipi di linfoma in

INFILTRAZIONE LINFOIDE nel MIDOLLO		
Cellularità	n. casi	%
Cellularità NORMALE	26	55.3
Ipoplasia/Aplasia midollare	9	19.2
Ipoplasia eritroide	9	19.2
Ipoplasia mieloide	2	4.3
Iperplasia Mieloide-Ipoplasia Eritroide	1	2.1

Tabella 3.23: **Status midollare in presenza di infiltrazione linfoide in corso di linfoma (47 casi).**

causa nei soggetti con infiltrazione linfoide del midollo sono sostanzialmente gli stessi riscontrati nel caso del coinvolgimento blastico del circolo periferico (vedi tab. 3.20); in aggiunta a questi abbiamo un soggetto con linfoma mediastinico ed un soggetto con linfoma centrocitico-centroblastico (vedi tab. 3.24).

Per quanto riguarda l'invasione neoplastica si può inoltre notare che,

BLASTI NEL MIDOLLO		
Tipo di linfoma	n. casi	%
Centroblastico polimorfo	23	48.9
Linfoblastico	8	17
Centrocitico-Centroblastico	1	2.1
Immunoblastico	4	8.5
Pleomorfo	4	8.5
Centroblastico-Immunoblastico	1	2.1
A cell medie macronucleate	1	2.1
Linfoplasmocitico	2	4.3
Cutaneo	1	2.1
Mediastinico	1	2.1
Inclassificabile	1	2.1

Tabella 3.24: **Blasti nel midollo (47 casi): linfomi coinvolti.**

nonostante l'esame del midollo sia stato eseguito su un numero inferiore di soggetti (95) rispetto alla valutazione dello striscio ematico (eseguita su tutti i 120 casi), la presenza di cellule blastiche (o per meglio dire *linfoidi*) a questo livello è stata riscontrata in un maggior numero di casi (47 casi) rispetto alla presenza delle stesse nel circolo periferico (33 casi).

Infine nella tabella 3.25 sono riportati i risultati della valutazione degli indici midollari (misurati in 61 casi). Come si vede, il Rapporto Mieloi-de/Eritroide risulta elevato nel 44.3% (27/61) dei casi, a testimonianza del quadro di ipoplasia eritroide e/o iperplasia mieloide riscontrato in precedenza⁴. Per quanto riguarda la serie eritroide, il rapporto tra stadi maturativi e proliferativi (EMI) è normale in quasi il 60% dei soggetti (59%: 36/61), mentre si nota una prevalenza degli stadi maturativi rispetto a quelli proliferativi (\uparrow EMI, \downarrow I/Me) nel 37.7% (23/61): questo dato conferma il carattere non rigenerativo della maggior parte delle anemie riscontrate. Per la serie mieloide invece, il rapporto tra stadi maturativi e stadi proliferativi (MMI) è normale nel 65.6% (40/61) dei casi; nella restante parte dei soggetti, troviamo anche in questo caso un aumento della fase maturativa rispetto a quella

⁴21 casi in totale, tenendo conto anche dei soggetti con infiltrazione linfoide.

proliferativa.

INDICI MIDOLLARI	Normale		Basso		Alto	
	n. casi	%	n. casi	%	n. casi	%
M/E	32	52.5	2	3.3	27	44.3
EMI	36	59	2	3.3	23	37.7
I/Me	36	59	24	39.3	1	1.6
MMI	40	65.6	1	1.6	20	32.8
I/Mg	40	65.6	21	34.4	0	0
I/M	43	70.5	18	29.5	0	0

Tabella 3.25: **Esame del midollo: Indici Midollari in corso di linfoma (61 casi).** M/E, rapporto Mieloide/Eritroide; EMI, Indice di Maturazione Eritrocitaria; I/Me, Indice di Eritropoiesi; MMI, Indice di Maturazione Mieloide; I/Mg, Indice di Granulocitopoiesi; I/M, Indice di Mielopoiesi.

3.7 Profilo biochimico ed esame delle urine

In tabella 3.26 sono riportati i risultati della valutazione dei singoli analiti.

Come si può notare, non sempre è stato eseguito lo stesso pannello di analisi e questo ha rappresentato il principale ostacolo ad una valutazione omogenea dei soggetti in studio. Ad ogni modo, dalla valutazione del profilo biochimico, tenuto conto anche della storia clinica dei singoli, è emerso quanto segue: nel 18.3% dei casi (22/120) l'aumento degli enzimi epatici era dovuto ad un effetto corticosteroido-indotto, mentre un coinvolgimento epatico effettivo è stato riscontrato nel 16.7% (20/120) dei casi, con situazioni variabili dal danno epatocellulare, danno epatocellulare con colestasi, colestasi, fino alla vera e propria insufficienza epatica. La funzionalità renale, esplorata unitamente all'esame delle urine, è risultata alterata nel 5.8% (7/120) dei casi, mentre nel 5% (6/120) dei casi l'aumento dell'urea riscontrato era di origine prerenale. In entrambi i soggetti colpiti dalla forma alimentare si è riscontrata ipoprotidemia e ipocolesterolemia, in conseguenza dell'enteropatia proteino-disperdente. Nei restanti casi le alterazioni più rilevanti del profilo biochimico erano la conseguenza di una situazione di anoressia, dima-

PROFILO BIOCHIMICO								
ANALITI	Normale		Basso		Alto		Non valutato	
	n. casi	%	n. casi	%	n. casi	%	n. casi	%
BUN	91	75.8	6	5	14	11.7	9	7.5
Bil. tot.	75	62.5	-	-	11	9.2	34	28.3
Col. tot.	59	49.2	23	19.2	8	6.7	30	25
Crea.	78	65	14	11.7	8	6.7	20	16.7
Glu	72	60	10	8.3	3	2.5	35	29.2
α -Amil.	31	25.8	-	-	6	5	83	69.2
AST	56	46.7	-	-	29	24.2	35	29.2
ALT	58	48.3	-	-	40	33.3	22	18.3
AP	48	40	-	-	53	44.2	19	15.8
γ GT	48	40	-	-	30	25	42	35
Ca	93	77.5	7	5.8	8	6.7	12	10
P	79	65.8	2	1.7	6	5	33	27.5
Fe	30	25	17	14.2	13	10.8	60	50.
Alb.	90	75	7	5.8	1	0.8	22	18.3
Prot. tot.	84	70	11	9.2	6	5	19	15.8

Tabella 3.26: **Profilo biochimico: variazioni dei singoli analiti in corso si linfoma (120 casi).**

grimento o malnutrizione (riduzione dei livelli di colesterolo, glucosio, BUN, proteine totali, albumina, creatinina), di un'emorragia (ipoprotidemia con ipoalbuminemia), o di una forte disidratazione (iperprotidemia). In un soggetto l'unica alterazione riscontrata è stata un aumento delle proteine totali dovuto alla presenza concomitante di Leishmaniosi. Infine nel 10% (12/120) dei casi non è stato possibile valutare adeguatamente le diverse funzionalità organiche per la mancanza di informazioni (vedi tab 3.27).

Per quanto riguarda gli elettroliti (vedi tab. 3.28) vediamo come il *calcio*, valutato su 108 soggetti, è risultato normale per la maggior parte di questi (86.1%: 93/108), mentre è risultato alto solo nel 7.4% (8/108) dei casi. I linfomi coinvolti in questi soggetti con ipercalcemia erano: centrocitico-centroblastico (2 casi), centroblastico (2 casi), linfoblastico a probabile fenotipo T (2 casi; entrambi presentavano osteoclasti a livello midollare), plasmocitoide a probabile fenotipo T (1 caso) e mediastinico (1 caso). Il *fosforo*,

PROFILO BIOCHIMICO		
Alterazioni	n. casi	%
NORMALE	46	38.3
Induzione enzimi epatici	19	15.8
↑ PT da disidratazione (Hct alto)	1	0.8
↑ PT per ↑ γ glob (Leishmaniosi)	1	0.8
↓ PT (con ↓ Alb) da perdita ematica	2	1.7
↓ PT, ↓ Col per enteropatia proteinodisperdente	2	1.7
↓ Col da dimagrimento	2	1.7
↓ Glu da anoressia, induzione enzimi epatici	1	0.8
↓ BUN da malnutrizione	2	1.7
↑ BUN, ↑ Amil prerenale	5	4.2
↑ BUN prerenale, ↓ Col-PT-Alb da anoressia, ↓ Crea per atrofia m.lare	1	0.8
Danno epatocellulare	5	4.2
Danno epatocellulare, ↓ Proteine tot. da anoressia	1	0.8
Danno epatocellulare con colestasi	3	2.5
Danno epatocellulare, colestasi, ipocol-ipocreat da dimagrim.	1	0.8
Colestasi	3	2.5
Insufficienza epatica	6	5
Insufficienza renale e induzione enzimi epatici	2	1.7
Insufficienza renale e danno epatobiliare con colestasi	1	0.8
Insufficienza renale	4	3.3
Biochimico ASSENTE/NON VALUTABILE	12	10

Tabella 3.27: **Profilo biochimico: alterazioni riscontrate in corso di linfoma (120 casi).**

valutato su 87 soggetti, è risultato anch'esso normale per la maggior parte di questi (90.8%: 79/87), mentre è risultato alto nel 6.9% (6/87) dei casi, ovvero in quei soggetti che presentavano un coinvolgimento renale. Il *ferro* è stato valutato su 60 soggetti ed è risultato normale nella metà di questi (50%: 30/60), basso nel 28.3% (17/60), a testimonianza di un probabile processo infiammatorio cronico (effettivamente confermato dal quadro elettroforetico e/o dal leucogramma in 9/17 soggetti), mentre è stato trovato alto nel 21.7% (13/60) dei casi (tra questi 7/13 avevano ricevuto cortisone nel periodo precedente, mentre 3/13 presentavano segni di danno epatico).

ELETTROLITI	Calcio		Fosforo		Ferro	
	n. casi	%	n. casi	%	n. casi	%
Normale	93	86.1	79	90.8	30	50
Basso	7	6.5	2	2.3	17	28.3
Alto	8	7.4	6	6.9	13	21.7

Tabella 3.28: **Variazioni degli elettroliti in corso di linfoma: Calcio (108 casi), Fosforo (87 casi), Ferro (60 casi).**

L'esame delle urine è stato eseguito in 83 casi e, come detto, è stato valutato unitamente al profilo biochimico e alla storia clinica dei soggetti. In particolare si è focalizzata l'attenzione su due parametri: peso specifico ed eventuale proteinuria. Come si può vedere nella tabella 3.29, il 4.8% (4/83) dei casi presentava urina ipostenurica (di questi 1/4 aveva assunto cortisone), il 18.1% (15/83) presentava urina isostenurica (di questi 8/15 avevano assunto cortisone), mentre l'8.4% (7/83) presentava un quadro di assoluta normalità. Il restante 68.7% (57/83) presentava proteinuria, che si è rivelata essere non significativa in 37 casi, di origine pre/postrenale o renale (con iperstenuria) in 11 casi, di origine renale con iso/ipostenuria (quindi indicativa di un danno renale) in 9 casi.

URINE				
p.s.	prot.	n. casi	%	Interpretazione
1000 – 1008	ass	4	4.8	Ipostenuria
1009 – 1018	ass	15	18.1	Isostenuria
1019 – 1025	ass/+1	7	8.4	NORMALE
>1025	ass/+2	37	44.6	Proteinuria NON significativa
>1025	>+2	11	13.3	Proteinuria Pre/Postrenale o Renale
<1018	≥+1	9	10.8	Proteinuria RENALE

Tabella 3.29: **Esame delle urine: valutazione del peso specifico e della proteinuria in corso di linfoma (83 casi).**

3.8 Profilo coagulativo

Il profilo coagulativo è stato eseguito in 97 casi. Come si può vedere nella tabella 3.30, il PT risulta allungato solo nel 19.6% (19/97) dei casi e tra questi soltanto in un soggetto l'aumento è da considerarsi significativo poichè superiore a quattro volte il valore di riferimento (negli altri è sempre inferiore al doppio). L'aPTT risulta allungato in un numero ancora inferiore di soggetti (4.1%: 4/97); anche in questo caso soltanto in un soggetto (lo stesso del precedente) l'entità di tale aumento poteva considerarsi significativa (tre volte il valore di riferimento). Il fibrinogeno invece risulta aumentato in un numero superiore di casi, ovvero nel 27.8% dei casi (27/97), a testimoniare un processo infiammatorio in corso.

PROFILO COAGULATIVO						
Parametri	PT		aPTT		Fibrinogeno	
	n. casi	%	n. casi	%	n. casi	%
Normale	78	80.4	93	95.9	70	72.2
Alto	19	19.6	4	4.1	27	27.8

Tabella 3.30: **Profilo coagulativo di base: alterazioni in corso di linfoma (97 casi).**

3.9 Elettroforesi delle sieroproteine

L'elettroforesi è stata eseguita in 52 casi. In tabella 3.31 sono riportati i risultati dell'analisi dei singoli parametri.

SIEROELETTROFORESI						
	Normale		Basso		Alto	
	n. casi	%	n. casi	%	n. casi	%
Alb	23	44.2	28	53.8	1	1.9
$\alpha 1$	34	65.4	5	9.6	13	25
$\alpha 2$	23	44.2	1	1.9	28	53.8
β	23	44.2	5	9.6	24	46.6
$\beta 1$	31	59.6	3	5.8	18	34.6
$\beta 2$	31	59.6	2	3.8	19	36.5
γ	29	55.8	14	26.9	9	17.3
A/G	36	69.2	11	21.2	5	9.6

Tabella 3.31: **Elettroforesi delle proteine del siero: variazione dei singoli parametri in corso di linfoma (52 casi).**

L'interpretazione dei singoli quadri elettroforetici, eseguita contestualmente alla storia clinica dei soggetti, ha portato al seguente risultato: una situazione di assoluta normalità è stata riscontrata solo nel 15.4% (8/52) dei casi, mentre nel 21.2% (11/52) il quadro riscontrato era attribuibile all'effetto di corticosteroidi (tra questi 8/11 avevano subito un trattamento con tali farmaci in precedenza). Il restante 63.5% (33/52) presentava invece una situazione di infiammazione che, anche nel caso di quest'analisi, è risultata essere cronica nella maggior parte dei soggetti, confermando quanto detto in precedenza (vedi tab 3.32).

3.10 Sierologia

I test sierologici sono stati eseguiti per la ricerca di anticorpi nei confronti di *Leishmania i.* (69 casi), *Ehrlichia c.* (67 casi) e *Rickettsia r.* (37 casi). I risultati sono riportati nella tabella 3.33.

SIEROELETTROFORESI		
Quadro elettroforetico	n. casi	%
NORMALE	8	15.4
Corticosteroidi	11	21.2
Infiammazione Subacuta/Acuta	5	9.6
Infiammazione Acuta/Cronica	9	17.3
Infiammazione Cronica	9	17.3
Infiammazione Cronica + Corticosteroidi	10	19.2

Tabella 3.32: Quadri elettroforetici in corso di linfoma (52 casi).

SIEROLOGIA					
	n. casi	%	Titolo	n. casi	%
Leishmania					
Negativi	58	84.1			
Positivi	11	15.9			
			1/40	7	63.6
			1/80	4	36.4
Ehrlichia					
Negativi	56	83.6			
Positivi	11	16.4			
			1/40	1	9.1
			1/80	9	81.8
			1/128	1	9.1
Rickettsia					
Negativi	35	94.6			
Positivi	2	5.4			
			1/80	1	50
			1/1280	1	50

Tabella 3.33: Sierologia (IFI) per *Leishmania infantum* (69 casi), *Ehrlichia canis* (67 casi) e *Rickettsia rickettsii* (37 casi).

3.11 Follow up

I soggetti che sono stati messi in terapia presso il Dipartimento di Clinica Veterinaria e di cui si ha il follow up completo, sono in tutto 16: 8 maschi (di cui uno castrato) e 8 femmine (di cui una sterilizzata). Nella tabella 3.34 sono riassunti i dati epidemiologici.

Come si può vedere dalla tabella, si tratta di 15 soggetti con linfoma multicentrico ed un soggetto con linfoma cutaneo. Un soggetto si è presentato con malattia allo stadio II (substadio a), 3 soggetti allo stadio III (2 a + 1 b), 6 soggetti allo stadio IV (2 a + 4 b) e 6 soggetti allo stadio V (2 a + 4 b).

Ad eccezione di un caso (il numero 6) che presenta una forma di linfoma a basso grado di malignità (centrocitico-centroblastico a *probabile*⁵ fenotipo B), tutti i soggetti sono colpiti da forme ad alto grado di malignità, per la maggior parte a *probabile* fenotipo B (centroblastico polimorfo, 11 casi⁶); in due casi il fenotipo in causa era il T (linfoma cutaneo⁷ e pleomorfo), mentre nei restanti due (centroblastico-immunoblastico e immunoblastico) il fenotipo poteva essere sia B che T, ma non si è ricorsi all'immunofenotipizzazione per determinarlo.

In base alla risposta alla terapia che si è riusciti ad ottenere possiamo suddividerli in quattro gruppi principali:

Gruppo 1 Remissione assente

Gruppo 2 Remissione parziale

Gruppo 3 Remissione completa e ricaduta

Gruppo 4 Due (o tre) remissioni complete, due (o tre) ricadute.

⁵Il fenotipo è stato definito *probabile* B o T in base alle caratteristiche citologiche dello striscio linfonodale, ma non è stato confermato dall'immunofenotipizzazione.

⁶Soltanto in un caso è stata effettuata l'immunofenotipizzazione, che ha confermato il fenotipo B.

⁷Confermato dall'immunofenotipizzazione.

Casi	Razza	Sesso	Età (anni)	Tipo Anatom.	Inizio sintomi (settimane)	1 ^a visita	Cortisone (da quanto)	Stadio (Subst.)	Tipo Citolog.	Fenotipo
GRUPPO 1										
1	Meticcio	f	13	M	12	08/11/99	-	II (a)	C.I.	?
2	Bull Terrier	m	8.6	M	4	07/12/99	-	IV (b)	C.p.	prob. B
3	Pastore Ted.	m	9.3	M	3	03/9/02	Si (1 sett)	V (a)	C.p.	prob. B
GRUPPO 2										
4	Meticcio	m c	7	M	16	08/02/00	Si (4 gg)	V (b)	C.p.	prob B
5	Meticcio	f	7	M	1	05/07/00	-	IV (a)	I.	?
GRUPPO 3										
6	Meticcio	f s	11.3	M	3	03/02/99	-	III (a)	C.C.	prob. B
7	Pastore Ted.	f	4.1	M	1	18/01/00	-	III (b)	C.p.	prob. B
8	Pastore Ted.	m	11.2	M	3	07/2/00	Si (20 gg)	IV (b)	C.p.	prob. B
9	Boxer	f	5.4	C	6	07/10/03	-	III (a)	Cut.	T
10	Fox Terrier	f	8	M	1	25/5/04	-	V (b)	C.p.	prob. B
11	Bull Mastiff	f	6.1	M	3	23/2/05	-	V (b)	C.p.	prob. B
12	Meticcio	m	5.2	M	20	22/6/06	Si (n.s.)	IV (a)	C.p.	B
GRUPPO 4										
13	Alano	m	7.3	M	4	11/05/99	Si (n.s.)	IV (b)	C.p.	prob. B
14	Bull Mastiff	m	4.3	M	3	09/06/99	-	IV (b)	C.p.	prob. B
15	Pastore Ted.	f	6	M	1	27/4/00	-	V (b)	C.p.	prob. B
16	Setter Irl.	m	6.9	M	8	10/5/01	-	V (a)	Pleo.	prob. T

Tabella 3.34: **Follow up: dati epidemiologici (16 casi).** M, Multicentrico; C, Cutaneo; n.s., non specificato; C.I., linfoma Centroblastico Immunoblastico; C.p., linfoma Centroblastico polimorfo; I., linfoma Immunoblastico; C.C., linfoma Centrocitico Centroblastico; Cut., linfoma Cutaneo T epiteliotropo; Pleo., linfoma Pleomorfo a grandi cellule; prob., probabile

Nel complesso il *tasso di risposta* ottenuto è dell'81.3% (13/16), mentre il *tasso di risposta completa* è del 68.7% (11/16: gruppi 3 e 4) e il *periodo di sopravvivenza* mediano è di 27 settimane (range: 7-75 settimane). In figura 3.1 è riportata la curva di sopravvivenza di Kaplan-Meier per tutti i 16 soggetti considerati.

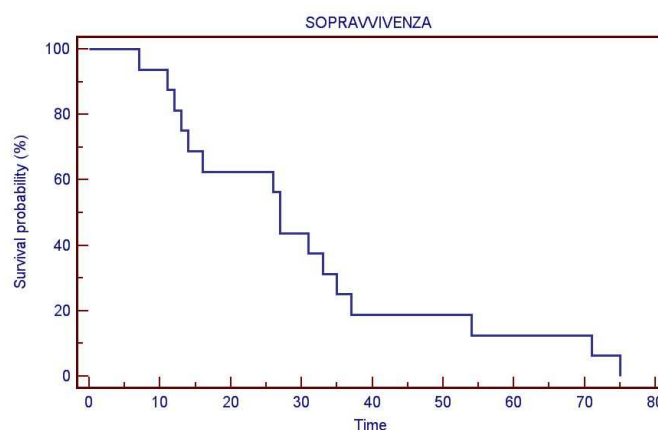


Figura 3.1: Curva di sopravvivenza di Kaplan-Meier per 16 cani con linfoma trattati con protocollo COP o CHOP (vedi testo). Time: settimane.

La *remissione completa* si è avuta dopo un periodo mediano di 5 settimane dall'inizio della chemioterapia; in questi soggetti la *recidiva* si è presentata dopo un periodo mediano di 10 settimane⁸ dalla remissione, ovvero dopo un periodo mediano di 16 settimane dall'inizio della chemioterapia.

In quattro soggetti (gruppo 4) si è riusciti ad ottenere una seconda remissione che è avvenuta dopo un periodo mediano di 8 settimane dalla prima recidiva ed ha avuto una durata mediana di 4 settimane fino a che non si è presentata una seconda recidiva. In questi stessi soggetti la prima remissione aveva avuto una durata mediana di 15.5 settimane: la seconda remissione ha avuto quindi durata inferiore rispetto alla prima.

In un soggetto (appartenente al gruppo 4) si è riusciti ad ottenere an-

⁸Durata mediana della prima remissione.

che una terza remissione completa a distanza di 4 settimane dalla seconda recidiva; la terza recidiva si è poi presentata dopo 8 settimane.

Gli effetti collaterali della chemioterapia riportati sono riassunti nella tabella 3.35, con le relative frequenze.

TOSSICITA' CHEMIOTERAPIA		
Effetti collaterali	n. casi	%
Diarrea	11	68.8
Vomito	9	56.3
Abbattimento	4	25
PU/PD	4	25
Lesioni perivenose da farmaco*	4	25
Disoressia	3	18.8
Tossicità midollare**	3	18.8

Tabella 3.35: **Effetti collaterali della chemioterapia (16 casi).** *Doxorubicina; **Ciclofosfamide.

Come si può vedere la tossicità più frequentemente riscontrata è quella gastroenterica (soprattutto diarrea e vomito); la tossicità midollare si è presentata solo nel 18.8% (3/16) dei casi.

3.11.1 Gruppo 1.

Questo gruppo comprende quei soggetti in cui non si è mai riusciti ad ottenere una remissione (vedi tab. 3.36).

Tra questi il periodo di sopravvivenza mediano è di 11 settimane.

GRUPPO 1: Remissione assente			
CASI	Induzione	Intensificazione	Decesso (sett.)
1	COP	Mitox	27 ^a
2	COP	Doxo, Lomu, Mitox	11 ^a
3	CHOP	L-Aspa	7 ^a

Tabella 3.36: **GRUPPO 1.** Mitox, Mitoxantrone; Doxo, Doxorubicina; Lomu, Lomustina; L-Aspa, L-Asparaginasi.

CASO 1. Meticcio, femmina, 13 anni; inizio sintomi da circa 3 mesi. Linfoma multicentrico, stadio II a, centroblastico-immunoblastico.

Alla prima visita presenta condizioni generali buone, linfadenomegalia del linfonodo retrofaringeo destro, iperplasia gengivale; emogramma nella norma, linfopenia senza leucopenia; profilo coagulativo nella norma; esame del midollo non eseguito; profilo biochimico non valutabile; esame delle urine non eseguito; quadro elettroforetico da infiammazione acuta/cronica.

Inizia protocollo COP⁹. Dopo 1 settimana di terapia presenta leucopenia, alla 7^a settimana ancora non si ottiene remissione (linfadenomegalia sottomandibolare) e si passa al Mitoxantrone (una volta ogni tre settimane); alla 14^a settimana presenta febbre, stato di malessere generale, ulcere nel cavo orale, leucopenia persistente e linfadenomegalia sottomandibolare e prescapolare. Si continua con Mitoxantrone, il quadro peggiora progressivamente nelle settimane successive fino a sviluppare anche linfadenomegalia generalizzata. Il decesso avviene alla 27^a settimana.

CASO 2. Bull terrier, maschio, 8.6 anni; inizio sintomi da circa 1 mese. Linfoma multicentrico, stadio IV b, centroblastico polimorfo.

Alla prima visita presenta depressione del sensorio, linfadenomegalia dei sottomandibolari e poplitei, epato-splenomegalia; anemia leggera normocitica normocromica, trombocitopenia, leucogramma basale; profilo coagulativo nella norma, ma aumento del fibrinogeno; esame del midollo non eseguito; profilo biochimico con segni di colestasi; segni di infezione delle vie urogenitali all'esame delle urine; quadro elettroforetico da infiammazione acuta/cronica; positivo a *Leishmania i.* (1/80) e *Rickettsia r.* (1/80).

Inizia protocollo COP. Alla 5^a settimana ancora non si è ottenuta remissione e si effettua una somministrazione di Doxorubicina; nelle settimane successive continua la terapia con Vincristina (una volta a settimana), ma persiste ancora la linfadenomegalia; in 7^a settimana inoltre si sommini-

⁹Chemioterapici del protocollo COP: Ciclofosfamide, Vincristina, Prednisone

stra Lomustina. I sintomi peggiorano progressivamente; in 10^a settimana si somministra Mitoxantrone, ma dopo pochi giorni l'animale presenta abbattimento, vomito, linfadenomegalia sottomandibolare, difficoltà respiratoria grave. Il decesso avviene alla 11^a settimana.

CASO 3. Pastore tedesco, maschio, 9.3 anni; inizio sintomi da 20 giorni; in terapia con cortisone da una settimana. Linfoma multicentrico, stadio V a, centroblastico polimorfo.

Alla prima visita presenta dimagrimento, tachipnea, lieve disidratazione, linfadenomegalia dei sottomandibolari e perifaringei, splenomegalia, riduzione di tono e masse muscolari; anemia leggera normocitica normocromica, stoma piastrinica ridotta, leucogramma da corticosteroidi; midollo con ipoplasia eritroide e infiltrazione blastica; profilo biochimico con induzione degli enzimi epatici; urine nella norma; quadro elettroforetico da infiammazione acuta/cronica; positivo a *Leishmania i.* (1/40).

Inizia protocollo CHOP¹⁰. Alla 2^a settimana presenta aumento di volume anche dei linfonodi prescapolari e poplitei; in 5^a settimana persiste ancora splenomegalia, linfadenomegalia del perifaringeo sinistro e del popliteo destro, inoltre il proprietario riferisce di ripetuti episodi diarroici nelle due settimane precedenti. Alla 6^a settimana presenta febbre, atassia sul treno posteriore, PU/PD, pallore delle mucose, linfadenomegalia generalizzata. Viene somministrata L-Asparaginasi, ma il decesso avviene alla 7^a settimana.

3.11.2 Gruppo 2.

Questo gruppo comprende quei soggetti in cui non si è mai riusciti ad ottenere una remissione completa, ma solo parziale (vedi tab. 3.37).

Tra questi il periodo di sopravvivenza mediano è di 23 settimane.

¹⁰Chemioterapici del protocollo CHOP: Ciclofosfamide, Vincristina, Prednisone, Doxorubicina

GRUPPO 2: Remissione parziale			
CASI	Induzione	Intensificazione	Decesso (sett.)
4	COP	Mitox, Doxo	13 ^a
5	COP	Doxo, L-Aspa, Pred, Cloram, Citar	33 ^a

Tabella 3.37: **GRUPPO 2.** Mitox, Mitoxantrone; Doxo, Doxorubicina; Lomu, Lomustina; L-Aspa, L-Asparaginasi; Pred, Prednisone; Cloram, Clorambucile; Citar, Citarabina.

CASO 4. Meticcio, maschio castrato, 7 anni; inizio sintomi da 4 mesi; in terapia con cortisone da 4 giorni. Linfoma multicentrico, stadio V b, centroblastico polimorfo.

Alla prima visita presenta dimagrimento, pallore delle mucose, linfadenomegalia generalizzata, epato-splenomegalia; anemia moderata normocitica normocromica rigenerativa, leucogramma leucemico; allungamento del PT non significativo; midollo osseo con lieve infiltrazione linfocitaria, ma ancora funzionante; profilo biochimico con induzione degli enzimi epatici, ipoprotidemia con ipoalbuminemia; urine isostenuriche; quadro elettroforetico da infiammazione cronica.

Inizia protocollo COP. Alla 3^a settimana presenta leucopenia e sospende Ciclofosfamide; presenta ancora linfadenomegalia del popliteo sinistro ed epato-splenomegalia; nelle settimane successive si ha riduzione (mai completa) del popliteo, fino alla 7^a, quando presenta nuovamente linfadenomegalia di entrambi i poplitei e dei perifaringei; si inizia terapia con Mitoxantrone (una volta ogni tre settimane), senza risultati. In 11^a settimana si somministra Doxorubicina. Il decesso avviene alla 13^a settimana.

CASO 5. Meticcio, femmina, 7 anni; inizio sintomi da una settimana. Linfoma multicentrico, stadio IV a, immunoblastico polimorfo.

Alla prima visita presentava linfadenomegalia generalizzata, soprattutto a carico dei prescapolari, poplitei e sottomandibolari, splenomegalia; emogramma nella norma, linfopenia; profilo coagulativo con aumento del PT

non significativo; midollo osseo con ipoplasia della fase proliferativa mieloidale e lieve infiltrazione blastica; profilo biochimico nella norma; esame delle urine nella norma; elettroforesi non eseguita.

Inizia terapia con COP. Dopo sette settimane persiste una lieve linfadenomegalia generalizzata; alla 9^a settimana presenta linfadenomegalia soprattutto a carico dei sottomandibolari, poplitei e prescapolari e si inizia terapia con Doxorubicina. Alla 19^a settimana presenta ancora linfadenomegalia dei poplitei e del prescapolare sinistro: si somministra L-Asparaginasi e si passa a terapia con Clorambucile e Prednisone. Alla 23^a settimana presenta lieve linfadenomegalia e splenomegalia (remissione parziale), tosse: alla terapia precedente si aggiunge Citarabina. Nelle settimane successive persiste sempre la linfadenomegalia e la splenomegalia, fino alla 28^a settimana, quando, oltre alla splenomegalia, presenta vomito, affaticamento, respiro dispnoico, murmure rinforzato. Alla 30^a settimana ha anoressia, febbre, mucose pallide, respiro dispnoico; si somministra L-Asparaginasi. Alla 32^a settimana il respiro si fa discordante, le mucose sono cianotiche, la tosse è profonda, compare versamento pleurico e aumento di volume dell'addome. Il decesso avviene alla 33^a settimana.

3.11.3 Gruppo 3.

Questo gruppo comprende quei soggetti in cui, dopo una prima remissione completa e la successiva ricaduta, non si è riusciti ad ottenere una seconda remissione completa (vedi tab 3.38).

In media la *remissione completa* è avvenuta a 6.3 settimane dall'inizio della terapia e la *ricaduta* 11.9 settimane dopo la remissione completa.

Il periodo di sopravvivenza mediano è di 26 settimane.

GRUPPO 3: Una remissione completa e una ricaduta						
CASI	Induz.	Intensif.	RC (sett.)	Manten.	Ricaduta (sett.)	Reinduz. Decesso (sett)
6	COP	-	4 ^a	LMP	34 ^a	D-MAC 35 ^a
7	Doxo, Pred	-	3 ^a	stessa tx	8 ^a	stessa tx 26 ^a
8	COP	-	4 ^a	stessa tx	8 ^a	Doxo 14 ^a
9	Cfx, Pred	COP	19 ^a	stessa tx	34 ^a	stessa tx, poi Doxo, 54 ^a
10	COP	-	2 ^a	stessa tx, Cloramb	6 ^a	Dacarb 16 ^a
11	COP	-	6 ^a	LMP	18 ^a	Vcr, Pred, Doxo 27 ^a
12	COP	Doxo	6 ^a	stessa tx	9 ^a	Doxo, Cfx, Pred, Vcr 12 ^a

Tabella 3.38: **GRUPPO 3.** RC, Remissione Completa.

CASO 6. Meticcio, femmina sterilizzata, 11.3 anni; inizio sintomi da 20 giorni. Linfoma multicentrico, stadio III a, centrocitico-centroblastico.

Alla prima visita presentava stato di nutrizione buono, soffio sistolico, tachipnea, linfadenomegalia dei sottomandibolari, prescapolari e poplitei; emogramma e leucogramma nella norma; midollo nella norma; profilo biochimico con segni di danno epatobiliare; urine nella norma; presenza di granuli miliari diffusi, aumento della trama interstiziale e aumento di volume del linfonodo mediastinico craniale alla radiografia al torace.

Inizia protocollo COP. Alla 4^a settimana si ottiene *remissione completa*; continua la terapia precedente. Alla 20^a settimana si inizia il protocollo di mantenimento LMP¹¹. Alla 34^a settimana presenta nuovamente linfadenomegalia generalizzata (compresi gli inguinali) con splenomegalia e atassia sul posteriore (*ricaduta*), inizia il protocollo di reinduzione D-MAC¹² con aggiunta di Clorambucile, ma alla fine i proprietari optano per l'eutanasia (35^a settimana).

CASO 7. Pastore tedesco, femmina, 4.1 anni; inizio sintomi da una settimana. Linfoma multicentrico, stadio III b, centroblastico polimorfo.

Alla prima visita presentava dimagrimento, febbre, linfadenomegalia generalizzata, diarrea; emogramma nella norma, stima piastrinica inadeguata, leucogramma infiammatorio, aumento del PT non significativo; plasma itterico; esame del midollo non eseguito; profilo biochimico con segni di colestasi; esame delle urine non eseguito; ipogammaglobulinemia all'esame elettroforetico.

Inizia terapia con Doxorubicina e Prednisone. La *remissione completa* si ottiene nella 3^a settimana; continua con la stessa terapia. All'8^a settimana presenta aumento di volume dei sottomandibolari (*ricaduta*); continua la terapia con Doxorubicina e Prednisone, ma nelle settimane successive la

¹¹Chemioterapici del protocollo LMP: Clorambucile, Metotressato, Prednisone

¹²Chemioterapici del protocollo D-MAC: Desametasone, Actinomicina D, Citarabina, Melphalan

linfadenomegalia diventa nuovamente generalizzata fino a presentare anche affanno, abbattimento, disoressia, diarrea (24^a settimana). I disturbi respiratori e digerenti si fanno progressivamente ingravescenti fino alla 26^a settimana, quando avviene il decesso.

CASO 8. Pastore tedesco, maschio, 11.2 anni; inizio sintomi da 20 giorni, in terapia con prednisone dall'inizio delle manifestazioni (interrotto tre giorni prima). Linfoma multicentrico, stadio IV b, centroblastico polimorfo.

Alla prima visita presentava dimagrimento, febbre, mucose leggermente pallide, soffio sistolico mitralico di III grado, polso debole, tachipnea, linfadenomegalia generalizzata, epato-splenomegalia, aumento di volume dell'addome, presenza di due noduli cutanei sul collo (massa linfoide) e sul petto (massa benigna); emogramma nella norma, leucogramma infiammatorio cronico; profilo coagulativo nella norma; midollo osseo nella norma; profilo biochimico con induzione degli enzimi epatici; esame delle urine nella norma; quadro elettroforetico da cortisone.

Inizia terapia con protocollo COP. Dopo 4 settimane si ottiene *remissione completa*; continua con la stessa terapia fino all'8^a settimana, quando ricompare linfadenomegalia e splenomegalia (*ricaduta*). Comincia terapia con Doxorubicina, ma non si ottiene più remissione in seguito. Il decesso avviene alla 14^a settimana.

CASO 9. Boxer, femmina, 5.4 anni; inizio sintomi da 1.5 mesi. Linfoma cutaneo T epiteliotropo, stadio III a.

Alla prima visita presentava noduli sottocutanei diffusi e lieve aumento di volume dei linfonodi; emogramma nella norma, stima piastrinica ridotta, linfopenia; profilo coagulativo nella norma; profilo biochimico nella norma; esame delle urine ed elettroforesi non eseguiti.

Viene impostato protocollo COP, ma per il primo mese effettua solo terapia *per os*; dalla 5^a settimana comincia la terapia con Vincristina. Alla 19^a settimana i noduli risultano pressochè scomparsi (*remissione comple-*

ta); continua con la stessa terapia. Alla 34^a settimana ricompare un nodulo cutaneo con flogosi di aspetto circolare sopraelevato, di circa un cm di diametro, a livello della grassella (*ricaduta*); continua con la stessa terapia, ma alla 38^a settimana presenta noduli diffusi su tutto il corpo, aree alopeciche irregolari, iperpigmentate su collo, dorso e orecchie. Nelle settimane successive la situazione non accenna a migliorare, si somministra Doxorubicina alla 51^a settimana e Dacarbazina alla 53^a settimana. Il decesso avviene alla 54^a settimana.

CASO 10. Fox Terrier, femmina, 8 anni; inizio sintomi da una settimana. Linfoma multicentrico, stadio V, centroblastico polimorfo.

Alla prima visita presentava lieve dimagrimento, versamento pleurico, dispnea prevalentemente inspiratoria, linfadenomegalia generalizzata; anemia moderata normocitica ipercromica scarsamente rigenerativa, stima piastrinica inadeguata, leucogramma infiammatorio cronico; profilo coagulativo nella norma; midollo osseo normale con lieve infiltrazione linfoblastica; profilo biochimico con ipocolesterolemia e ipoprotidemia da malassorbimento (il proprietario riferisce diarrea e disappetenza); esame delle urine ed elettroforesi non eseguito; positività a *Leishmania i.* (1/40).

Inizia terapia con protocollo COP. Dopo due settimane presenta linfonodi nella norma (*remissione completa*), ma facile affaticamento, lieve pallore delle mucose (persiste l'anemia) e compare leucopenia. Dalla 5^a settimana si aggiunge Clorambucile. Alla 6^a settimana compare nuovamente linfadenomegalia generalizzata (*ricaduta*) e aumento di volume dell'addome; continua con la stessa terapia. Nelle settimane successive persiste l'anemia e la leucopenia, nella 15^a settimana si somministra Doxorubicina, ma il decesso avviene alla 16^a settimana.

CASO 11. Bull mastiff, femmina, 6.1 anni; inizio sintomi da 20 giorni. Linfoma multicentrico, stadio V b, centroblastico polimorfo.

Alla prima visita presentava febbre, dispnea, linfadenomegalia generalizzata, epatosplenomegalia, pattern bronchiale e interstiziale alla radiografia al torace. Emogramma nella norma, stima piastrinica inadeguata, eosinopenia, blasti in circolo; midollo osseo con cellularità nella norma ma con infiltrazione blastica; profilo biochimico nella norma; esame delle urine non eseguito; quadro elettroforetico da infiammazione acuta/cronica.

Inizia terapia con protocollo COP. La *remissione completa* si ottiene alla 6^a settimana e si passa al protocollo di mantenimento LMP. Alla 18^a settimana compare nuovamente linfadenomegalia generalizzata, inoltre il cane presenta anemia, leucopenia e stima piastrinica ridotta (*ricaduta*); si imposta nuovamente il protocollo COP, ma si aggiunge Doxorubicina (30 mg/m² una volta ogni tre settimane). Alla 20^a settimana si sospende la ciclofosfamide a causa della mielodepressione persistente. Non si ottiene più remissione e il decesso avviene alla 27^a settimana.

CASO 12. Meticcio, maschio, 5.2 anni; inizio sintomi da 5 mesi, in terapia con cortisone da un mese. Linfoma multicentrico, stadio IV a, centroblastico polimorfo.

Alla prima visita presentava pallore delle mucose, polipnea, linfadenomegalia generalizzata, lieve splenomegalia; anemia leggera normocitica normocromica, stima piastrinica inadeguata, leucogramma misto da infiammazione acuta e corticosteroidi; profilo coagulativo nella norma; midollo osseo nella norma; profilo biochimico con aumento dell'urea e dell'amilasi di origine pre-renale e induzione degli enzimi epatici; urine nella norma; elettroforesi non eseguita.

Inizia terapia con protocollo COP. In 3^a settimana i linfonodi sottomandibolari e poplitei sono ancora leggermente aumentati di volume; si aggiunge Doxorubicina. La *remissione completa* si ottiene alla 6^a settimana; continua con la stessa terapia. Alla 9^a settimana compare nuovamente linfadenome-

galia generalizzata, soprattutto a carico dei sottomandibolari (*ricaduta*). Si continua con la Doxorubicina, ma non si ottiene più remissione. Il decesso avviene alla 12^a settimana.

3.11.4 Gruppo 4.

Questo gruppo comprende quei soggetti in cui si è riusciti ad ottenere una prima, una seconda (e in un caso anche una terza) remissione completa dopo la prima (e la seconda) ricaduta (vedi tab. 3.39).

In media la *prima remissione completa* è avvenuta a 8 settimane dall'inizio della chemioterapia e la *prima ricaduta* si è avuta 16.3 settimane dopo la remissione completa. La *seconda remissione completa* è avvenuta, in media, 7.6 settimane dopo la prima ricaduta, mentre la *seconda ricaduta* si è avuta 4.5 settimane dopo la seconda remissione completa. Nel soggetto che ha presentato anche la *terza remissione completa*, questa è avvenuta 4 settimane dopo la seconda ricaduta, mentre la *terza ricaduta* si è presentata 8 settimane dopo questa. La sopravvivenza mediana in questo gruppo è di 54 settimane.

CASO 13. Alano, maschio, 7.3 anni; inizio sintomi da un mese, in terapia con cortisone (non specificato da quanto). Linfoma multicentrico, stadio IV b, centroblastico polimorfo.

Alla prima visita presentava dimagrimento, depressione del sensorio, polipnea, murmure respiratorio rinforzato, linfadenomegalia generalizzata, lieve splenomegalia; anemia leggera normocitica normocromica, leucogramma basale; profilo coagulativo nella norma; midollo osseo nella norma; profilo biochimico nella norma; esame delle urine con proteinuria renale; quadro elettroforetico da infiammazione acuta/cronica.

Inizia terapia con protocollo CHOP. La *prima remissione completa* si ottiene nella 6^a settimana e si passa al protocollo di mantenimento LMP. Nella 16^a settimana compare nuovamente linfadenomegalia dei sottomandibolari e poplitei (*prima ricaduta*); si imposta terapia di reinduzione con

GRUPPO 4: Due (o tre) remissioni complete e due (o tre) ricadute													
	I	I	I	I	I	I	I	II	II	II	III	III	Decesso
CASI	Ind.	Inten.	RC	Mant.	Ric.	Reind.	RC	Mant.	Ric.	Reind.	RC	Mant.	Ric.
			(sett.)		(sett.)		(sett.)		(sett.)		(sett.)		(sett.)
13	CHOP	-	6 ^a	LMP	16 ^a	Citar, Doxo, Vcr, Pred	23 ^a	Clor, Metotrex	30 ^a	Vcr, Pred	-	-	31 ^a
14	COP	-	5 ^a	LMP	11 ^a	Vcr, Doxo, Pred, Citar	17 ^a	LMP	20 ^a	Dacarb, Vcr, Doxo, Lomu	-	-	37 ^a
15	COP	Doxo	18 ^a	LMP	46 ^a	L-Aspa, Vcr	54 ^a	COP	58 ^a	L-Aspa, Doxo,	62 ^a	Doxo	71 ^a
16	COP	-	3 ^a	stessa tx, Cloranb	24 ^a	stessa tx, Doxo	32 ^a	stessa tx	36 ^a	L-Aspa, D-MAC	-	-	75 ^a

Tabella 3.39: **GRUPPO 4.** Ind., Induzione; Inten., Intensificazione; RC, Remissione Completa; Mant., Mantenimento; Ric., Ricaduta; Reind., Reinduzione.

Doxorubicina, Vincristina, Citarabina e Prednisone. La *seconda remissione completa* si ottiene alla 23^a settimana (ovvero dopo sette settimane dalla prima ricaduta); si imposta terapia con Clorambucile, Metotressato e Ciclofosfamide. La *seconda ricaduta* (linfadenomegalia, splenomegalia) si ha alla 30^a settimana (ovvero dopo 14 settimane dalla prima ricaduta); la citologia linfonodale mette in evidenza anche la presenza di Leishmanie; si predispone terapia con Vincristina, Prednisone, Antimoniato di n-metil-glucamina, ma il decesso avviene alla 31^a settimana.

CASO 14. Bull mastiff, maschio, 4.3 anni; inizio sintomi da 20 giorni. Linfoma multicentrico, stadio IV b, centroblastico polimorfo.

Alla prima visita presentava febbre, linfadenomegalia generalizzata (soprattutto a livello di inguinali e poplitei), splenomegalia; emogramma nella norma, leucogramma basale; profilo coagulativo, esame del midollo, profilo biochimico, esame delle urine nella norma; quadro elettroforetico da infiammazione acuta/cronica.

Inizia terapia con protocollo COP. La *prima remissione completa* si ottiene nella 5^a settimana e si passa al protocollo di mantenimento LMP. Nell'11^a settimana compare linfadenomegalia dei prescapolari e poplitei e splenomegalia (*prima ricaduta*). Si imposta terapia di reinduzione con Prednisone a giorni alterni, Doxorubicina e Citarabina; la *seconda remissione* si ottiene nella 17^a settimana (ovvero dopo sei settimane dalla prima ricaduta) e si passa nuovamente al protocollo di mantenimento LMP. Alla 20^a settimana compare linfadenomegalia dei prescapolari e poplitei (*seconda ricaduta*, dopo 9 settimane dalla prima ricaduta). Si somministra Dacarbazina alla 22^a settimana, Vincristina alla 24^a, Doxorubicina alla 27^a e 30^a, Lomustina alla 34^a ma durante tutto questo periodo la sintomatologia peggiora progressivamente, fino ad arrivare ad una situazione di febbre, anoressia, linfadenomegalia generalizzata, splenomegalia, dolorabilità addominale. Il decesso avviene alla 37^a settimana.

CASO 15. Pastore tedesco, femmina, 6 anni; inizio sintomi da una settimana. Linfoma multicentrico, stadio V b, centroblastico polimorfo.

Alla prima visita presentava pallore delle mucose, dispnea, linfadenomegalia generalizzata, splenomegalia; anemia moderata normocitica normocromica non rigenerativa, leucogramma leucemico; profilo coagulativo nella norma; midollo osseo normale, ma con infiltrazione blastica; profilo biochimico e urine nella norma; elettroforesi non eseguita.

Inizia terapia con protocollo COP. Alla 10^a settimana presenta remissione solo parziale (linfonodi sottomandibolari, prescapolari e poplitei, e milza sono ancora aumentati di volume) e dall'11^a settimana si passa alla somministrazione di Doxorubicina. La *prima remissione completa* si ottiene solo alla 18^a settimana, continua la stessa terapia, poi dalla 30^a settimana passa al protocollo di mantenimento LMP. Alla 46^a settimana compare nuovamente splenomegalia (*prima ricaduta*) con aumento di volume della parte anteriore dell'addome; continua con la stessa terapia, ma dalla 51^a settimana si somministra L-Asparaginasi e ricomincia protocollo COP. Alla 54^a settimana si ottiene la *seconda remissione completa* (ovvero dopo otto settimane dalla prima ricaduta); continua con la stessa terapia fino alla 58^a settimana, quando ripresenta lieve splenomegalia e lieve linfadenomegalia dei prescapolari (*seconda ricaduta*): si somministra L-Asparaginasi e si imposta terapia con Doxorubicina (una volta ogni tre settimane). Alla 62^a settimana linfonodi e milza sono nuovamente normali (*terza remissione*), continua la terapia con doxorubicina fino alla 70^a settimana, quando ricompare splenomegalia. Il decesso avviene alla 71^a settimana.

CASO 16. Setter irlandese, maschio, 6.9 anni; inizio sintomi da due mesi. Linfoma multicentrico, stadio V a, pleomorfo a grandi cellule.

Alla prima visita presenta linfadenomegalia dei prescapolari, inguinali e sottomandibolari; emogramma nella norma, eosinopenia, profilo coagulativo

nella norma; midollo osseo con infiltrazione blastica; profilo biochimico, urine e profilo elettroforetico nella norma.

Inizia terapia con protocollo COP. La *prima remissione completa* si ottiene nella 3^a settimana; continua con la stessa terapia, dalla 6^a settimana si aggiunge Clorambucile. Dall'11^a settimana interrompe la somministrazione di Vincristina, ma continua la terapia con Ciclofosfamide, Prednisone e Clorambucile; la situazione clinica rimane stabile fino alla 24^a settimana, quando presenta febbre, linfadenomegalia dei sottomandibolari, prescapolari, inguinali con edema ai genitali e al collo (*prima ricaduta*). Dalla 29^a settimana comincia terapia con Doxorubicina e alla 32^a settimana i linfonodi sono regrediti completamente (*seconda remissione*, dopo otto settimane dalla prima ricaduta); continua con la stessa terapia, ma alla 36^a settimana si ha nuovamente aumento di volume dei prescapolari e sottomandibolari (*seconda ricaduta*). Si continua con la Doxorubicina, ma dopo sei settimane i linfonodi ancora non sono regrediti, mentre anche gli inguinali risultano aumentati: si somministra L-Asparaginasi (42^a sett.), poi dalla 44^a settimana si imposta il protocollo di D-MAC. Nelle settimane successive si ottiene riduzione di volume dei linfonodi, ma la remissione non è mai completa. Dalla 53^a settimana i linfonodi cominciano gradatamente ad aumentare di volume, si continua con la stessa terapia, ma alla 72^a settimana il cane presenta una linfadenomegalia diffusa notevole. Il decesso avviene alla 75^a settimana.

3.11.5 Statistica inferenziale

E' d'obbligo ricordare che quest'analisi è stata condotta su un campione estremamente ridotto dal punto di vista numerico (16 casi): occorre quindi considerare ciascun risultato con rigorosa cautela.

Come si può vedere nella tabella 3.40, nessuno dei fattori esaminati è risultato significativamente associato al tasso di risposta completa (tutte le analisi hanno presentato valori di $P > 0.05$).

REMISSIONE COMPLETA	
Fattori associati	<i>P</i>
Età	0.4559
Sesso	1.0000
Cortisone	0.9420
Inizio Sintomi	0.2539
Stadio clinico	0.3095
Substadio	0.7340
Malignità	0.6761
Fenotipo	0.8942
Anemia	0.7340
Trombocitopenia	0.7340
Linfopenia	0.4370
Infiammazione	0.9420
Blasti in circolo	0.5455
Blasti nel m.o.	0.7340
Danno epatico	0.5455
Danno renale	0.6761
Induzione	0.6760
Tossicità chemioterapia	0.2099

Tabella 3.40: **Fattori associati al Tasso di remissione completa. Test del χ^2 .**

I risultati dell'analisi dei fattori relativi al segnalamento, all'anamnesi e alla malattia, dei reperti di laboratorio e dei fattori relativi alla terapia per la valutazione dell'associazione con il tempo di raggiungimento della remissione, il tempo di comparsa della ricaduta e il tempo di sopravvivenza sono riassunti nelle tabelle successive (3.41, 3.42, 3.43, 3.44, 3.45), che riportano il valore

mediano dei gruppi considerati per ciascuna variabile e il valore di P ottenuto dalla comparazione delle relative curve di sopravvivenza.

Nessun fattore è risultato significativamente associato al *tempo di raggiungimento della remissione completa*. Si nota comunque che questo è stato più lungo in quei soggetti in cui la malattia è stata diagnosticata con un ritardo di 5–8 settimane rispetto alla comparsa dei sintomi (Me^{13} : 11 settimane), nei soggetti con fenotipo T (Me : 11 sett.), e nei soggetti che alla prima visita presentavano linfopenia (Me : 19 sett.), infiammazione (Me : 11 sett.) e blasti in circolo (Me : 12 sett.).

Soltanto la presenza di uno stato infiammatorio (cronico) alla prima visita è risultato associato in maniera significativa al *tempo di comparsa della ricaduta* (Me : 9 sett.; P : 0.0085; vedi fig. 3.2). Si nota comunque che la

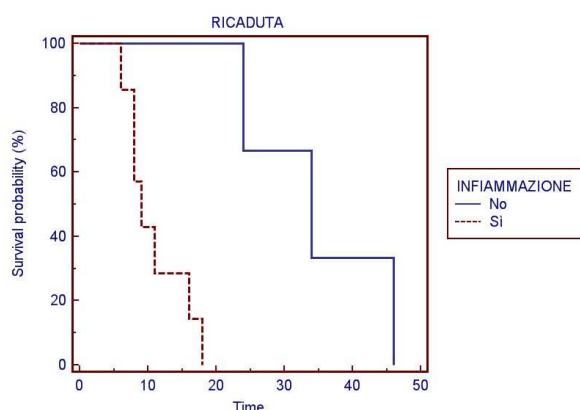


Figura 3.2: Curva di Kaplan-Meier per 16 cani con linfoma rappresentante il tempo di comparsa della ricaduta in relazione alla presenza di uno stato infiammatorio. Time: settimane. P : 0.0085.

recidiva si è presentata prima nei soggetti con meno di 5 anni (Me : 9.5 sett.), nei soggetti che erano stati precedentemente trattati con cortisone (Me : 9 sett.), in quelli in cui la malattia è stata diagnosticata con un ritardo superiore alle 12 settimane rispetto alla comparsa dei sintomi (Me : 9 sett.), nei soggetti con malattia al IV stadio (Me : 10 sett.), nei soggetti con trombo-

¹³ Me : valore mediano.

citopenia (Me : 9 sett.) e nel soggetto con protocollo d'induzione a base di Doxorubicina e Prednisone (8 sett.).

Infine due fattori sono risultati significativamente associati al *tempo di sopravvivenza*: il trattamento con cortisone come singolo agente precedentemente al trattamento chemioterapico (Me : 13 sett.; P : 0.0071) e la presenza di uno stato infiammatorio alla prima visita (Me : 16 sett.; P : 0.0028; vedi fig. 3.3).

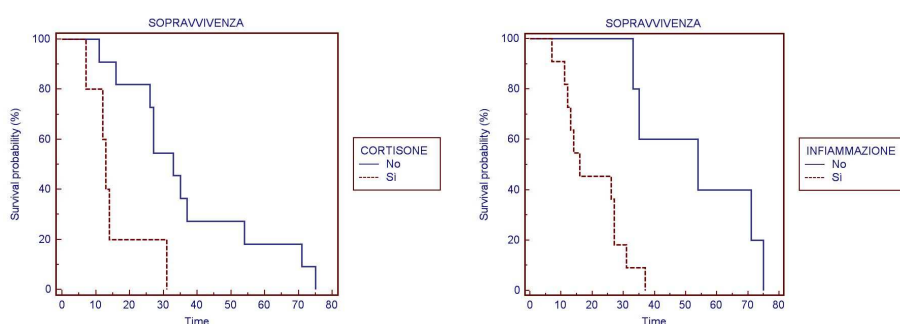


Figura 3.3: Curva di Kaplan-Meier per 16 cani con linfoma rappresentante la sopravvivenza dei soggetti in relazione al precedente trattamento con cortisone (P : 0.0071) e alla presenza di uno stato infiammatorio (P : 0.0028). Time: settimane.

Si nota inoltre che la durata della sopravvivenza è stata minore nei maschi (Me : 13.5 sett.), nei soggetti in cui la malattia è stata diagnosticata con un ritardo superiore alle 12 settimane rispetto alla comparsa dei sintomi (Me : 13 sett.), *stranamente* nei soggetti con linfoma di tipo B (Me : 16 sett.), nei soggetti con anemia (Me : 13 sett.) e trombocitopenia (Me : 16 sett.) e nei soggetti in cui il protocollo d'induzione impostato era il CHOP (Me : 19 sett.).

Fattori	REMISSIONE		RICADUTA		SOPRAVVIVENZA	
	<i>Me</i>	<i>P</i>	<i>Me</i>	<i>P</i>	<i>Me</i>	<i>P</i>
<u>Età</u>		0.3334		0.4285		0.5338
≤ 5 anni	4		9.5		31.5	
6-9 anni	6		18		31	
≥ 10 anni	4		21		20.5	
<u>Sesso</u>		0.4129		0.1666		0.6682
<i>M</i>	5		11		13.5	
<i>F</i>	5		26		27	

Tabella 3.41: **Fattori relativi al segnalamento associati al tempo di raggiungimento della *Remissione completa* (11 casi), tempo di comparsa della *Ricaduta* (11 casi) e tempo di *Sopravvivenza* (16 casi). Test del χ^2 (Logrank test).**
¹Pretrattamento; ²Rispetto alla prima visita; *Me*, valore mediano (in settimane).

Fattori	REMISSIONE		RICADUTA		SOPRAVVIVENZA	
	<i>Me</i>	<i>P</i>	<i>Me</i>	<i>P</i>	<i>Me</i>	<i>P</i>
<u>Cortisone¹</u>		0.9004		0.1207		0.0071
<i>Sì</i>	6		9		13	
<i>No</i>	4.5		21		33	
<u>Inizio sintomi²</u>		0.6833		0.5521		0.0968
1-4 settimane	4.5		13.5		27	
5-8 settimane	11		29		64.5	
≥ 12 settimane	6		9		13	

Tabella 3.42: **Fattori relativi all'anamnesi associati al tempo di raggiungimento della *Remissione completa* (11 casi), tempo di comparsa della *Ricaduta* (11 casi) e tempo di *Sopravvivenza* (16 casi). Test del χ^2 (Logrank test).**
¹Pretrattamento; ²Rispetto alla prima visita; *Me*, valore mediano (in settimane).

Fattori	REMISSIONE		RICADUTA		SOPRAVVIVENZA	
	<i>Me</i>	<i>P</i>	<i>Me</i>	<i>P</i>	<i>Me</i>	<i>P</i>
<u>Anemia</u>		0.7069		0.9125		0.1302
<i>Sì</i>	6		12.5		13	
<i>No</i>	4		14.5		33	
<u>Trombocitopenia</u>		0.5632		0.2532		0.0727
<i>Sì</i>	6		9		16	
<i>No</i>	4.5		24		33	
<u>Linfopenia</u>		0.0790		0.4743		0.6557
<i>Sì</i>	19		34		33	
<i>No</i>	4.5		11		26	
<u>Inflammazione¹</u>		0.2588		0.0085		0.0028
<i>Sì</i>	5		9		16	
<i>No</i>	11		34		54	
<u>Blasti in circolo</u>		0.3760		0.2027		0.7909
<i>Sì</i>	12		32		27	
<i>No</i>	4		13.5		27	
<u>Blasti nel m.o.</u>		0.7044		0.2879		0.4499
<i>Sì</i>	4.5		21		27	
<i>No</i>	5		10		27	
<u>Danno epatico</u>		0.1381		0.9505		0.4140
<i>Sì</i>	3.5		21		26	
<i>No</i>	6		14.5		27	
<u>Danno renale</u>		0.7324		0.6110		0.9260
<i>Sì</i>	6		16		31	
<i>No</i>	4.5		18		27	

Tabella 3.43: **Riscontri di laboratorio (della prima visita) associati al tempo di raggiungimento della *Remissione completa* (11 casi), tempo di comparsa della *Ricaduta* (11 casi) e tempo di *Sopravvivenza* (16 casi). Test del χ^2 (Logrank test).** ¹Presenza di leucogramma infiammatorio e/o quadro infiammatorio all'esame elettroforetico. *Me*, valore mediano (in settimane).

Fattori	REMISSIONE		RICADUTA		SOPRAVVIVENZA	
	<i>Me</i>	<i>P</i>	<i>Me</i>	<i>P</i>	<i>Me</i>	<i>P</i>
<u>Stadio</u>		0.9096		0.2896		0.8674
<i>II</i>	–		–		27	
<i>III</i>	4		34		35	
<i>IV</i>	5.5		10		31	
<i>V</i>	4.5		21		21.5	
<u>Substadio</u>		0.4912		0.3733		0.4877
<i>a</i>	5		29		33	
<i>b</i>	5		11		26.5	
<u>Grado di malignità¹</u>		0.4839		0.4388		0.7870
<i>Alto</i>	5		11		27	
<i>Basso</i>	4		34		35	
<u>Fenotipo</u>		0.3258		0.4430		0.2142
<i>B</i>	5		11		16	
<i>T</i>	11		29		64.5	
<i>?</i>	–		–		30	

Tabella 3.44: **Fattori relativi alla malattia associati al tempo di raggiungimento della *Remissione completa* (11 casi), tempo di comparsa della *Ricaduta* (11 casi) e tempo di *Sopravvivenza* (16 casi). Test del χ^2 (Logrank test).**¹Secondo la classificazione di Kiel. *Me*, valore mediano (in settimane).

Fattori	REMISSIONE		RICADUTA		SOPRAVVIVENZA	
	<i>Me</i>	<i>P</i>	<i>Me</i>	<i>P</i>	<i>Me</i>	<i>P</i>
<u>Induzione</u>		0.4029		0.3811		0.4545
<i>COP</i>	5		18		27	
<i>CHOP</i>	6		16		19	
<i>Doxo + Pred</i>	3		8		26	
<u>Tossicità</u>		0.3438		0.7241		0.9249
<i>Nessuna</i>	6		18		31	
<i>Gastro-Enterica</i>	4		16		21	
<i>Midollare + GE</i>	5		11		27	

Tabella 3.45: **Fattori relativi alla chemioterapia associati al tempo di raggiungimento della *Remissione completa* (11 casi), tempo di comparsa della *Ricaduta* (11 casi) e tempo di *Sopravvivenza* (16 casi). Test del χ^2 (Logrank test).** *Me*, valore mediano (in settimane).

Capitolo 4

DISCUSSIONE

La grande disomogeneità delle informazioni che erano a disposizione ha rappresentato la difficoltà maggiore nello svolgimento di questo lavoro. Le cartelle cliniche hanno rappresentato un grande fattore di variabilità come fonti d'informazione per questa tesi, data l'ampiezza dell'intervallo di tempo considerato. Le cartelle sono infatti variate negli anni, sia dal punto di vista grafico che dal punto di vista della completezza delle informazioni su di esse riportate. Mentre i primi modelli utilizzati prevedevano una forte concentrazione dei dati in un'unica pagina, a discapito soprattutto dello spazio dedicato alle informazioni anamnestiche, nei modelli degli ultimi anni (e tutt'ora in uso) si è preferito aumentare il numero di fogli di partenza in favore di una più completa, dettagliata e razionale raccolta delle informazioni, risultando quindi molto più utili per uno studio di questo tipo. Altro fattore di variabilità è stata la scelta del protocollo diagnostico, non sempre identico per tutti i soggetti: la spiegazione di questo va ricercata nell'indisponibilità stessa di alcuni accertamenti (ad esempio l'immunofenotipizzazione si è resa disponibile soltanto a partire dal 2003), nella ridotta disponibilità economica dei proprietari e nella difficoltà tecnica nell'esecuzione di certe procedure diagnostiche, riscontrata in alcuni casi. Il campione di 120 soggetti analizzato in questo studio rappresenta quindi il risultato finale di un lavoro di "scrematura" effettuato su di un campione iniziale più ampio e che ha por-

tato all'inclusione dei soli soggetti di cui si avevano sufficienti informazioni. Lo stesso discorso vale per i 16 soggetti su cui è stata effettuata l'analisi di sopravvivenza. L'esecuzione di quest'analisi su di un numero così ridotto (rispetto al campione di partenza di 120) trova spiegazione nel fatto che buona parte dei soggetti visitati, dopo la prima visita, non sono più tornati in cura presso il Dipartimento di Clinica Veterinaria, in altri casi i proprietari, venuti a conoscenza della diagnosi, hanno preferito non intraprendere un protocollo chemioterapico, altri ancora hanno optato direttamente per l'eutanasia. Di quelli rimasti in cura presso il Dipartimento di Clinica, soltanto 16 presentavano le cartelle cliniche accuratamente aggiornate per tutto il decorso della malattia e sono stati quindi considerati idonei per un'analisi di questo tipo.

La maggior parte dei cani analizzati aveva un'età compresa tra i 4 e i 9 anni al momento della diagnosi e l'età mediana riscontrata è stata di 7.15 anni, confermando quanto riportato in letteratura [24]. Per quanto riguarda le razze colpite, la prevalenza si è avuta nel meticcio, pastore tedesco, dobermann, boxer e rottweiler, confermando in parte quanto riportato in letteratura (golden retriever, boxer, basset hound, pastore tedesco, cocker spaniel, terriers) [8, 20], tuttavia per poter valutare al meglio questo dato sarebbe stato utile conoscere la distribuzione delle razze canine nell'ambito del territorio considerato. Nonostante non sia riportata una predisposizione di sesso, in questo studio è stata riscontrata una leggera maggioranza nei maschi (55.8%) rispetto alle femmine (44.2%); tra le femmine la maggior parte (66%) sono intere e questo potrebbe confermare l'ipotesi di un rischio maggiore tra le femmine intere rispetto a quelle sterilizzate [61].

Per quanto riguarda le forme anatomiche, la prevalenza della forma multicentrica (95%) rispetto alle altre conferma quanto riportato, tuttavia la proporzione tra le diverse forme (le forme alimentare, mediastinica e cutanea sono state riscontrate in percentuali identiche) è probabilmente *falsata*: infatti non è raro che casi di linfoma alimentare e mediastinico vengano con-

siderati direttamente come “chirurgici”, e quindi non visitati presso la sezione di Medicina del Dipartimento di Clinica. La prevalenza delle forme ad alto grado di malignità (82.5%) e tra queste dei tipi citologici centroblastico polimorfo, linfoblastico e immunoblastico, conferma quanto riportato in letteratura [10, 31, 71]. Sebbene l’immunofenotipizzazione sia stata eseguita su un ristretto numero di soggetti, la prevalenza del fenotipo B (68.2%) ed una percentuale comunque elevata di cani con linfoma T (31.8%), rispetto a quanto riscontrato nell’uomo, conferma quanto riportato in letteratura per il cane [71]. Nei cani con linfoma cutaneo presenti in questo studio, un soggetto era a fenotipo T, mentre l’altro caso è stato considerato un *probabile T*, ma non è stata effettuata l’immunofenotipizzazione: questo dato potrebbe confermare quanto riportato in letteratura (ovvero che la maggior parte delle forme cutanee appartengono al fenotipo T) [55], tuttavia due soli casi sono troppo pochi per esprimere un dato certo.

La maggior parte dei soggetti si è presentata alla prima visita presso il Dipartimento di Clinica Veterinaria con la malattia già al IV (20.2%) o V (45%) stadio, sebbene sia riportato che più frequentemente l’animale viene portato alla visita quando la malattia è al III stadio (quando cioè il proprietario si accorge della comparsa di “masse” in vari punti del corpo del proprio animale): nel nostro caso occorre considerare che pochi soggetti sono stati portati non appena sono comparsi i primi sintomi: trattandosi di visite di referenza, la maggior parte è arrivata al Dipartimento dopo un periodo superiore alle 3–4 settimane dall’inizio delle manifestazioni e spesso dopo aver già effettuato un tentativo terapeutico a base di solo prednisone (nel 44.2% dei casi). Per quanto riguarda la forma multicentrica, si osserva che il sintomo più comunemente riscontrato (96.5% dei cani) è stato la linfadenomegalia generalizzata (mentre la linfadenomegalia localizzata è stata trovata solo nel 3.5% dei casi); se si considera quanto riportato nell’anamnesi, si nota come anche in questo caso prevale la linfadenomegalia generalizzata (63.2%),

ma quella localizzata è riferita in percentuali superiori (26.3%), a conferma del fatto che frequentemente i proprietari si accorgono solo della presenza di masse evidenti (generalmente a livello sottomandibolare), mentre l'eventuale interessamento degli altri linfonodi emerge soltanto al momento della visita. Circa la metà dei soggetti presentava inoltre splenomegalia (52.6%), mentre l'epatomegalia si è presentata in misura inferiore (17.5%). Tra i sintomi aspecifici i più frequenti sono stati disoressia, febbre, dimagrimento, depressione del sensorio, poliuria/polidipsia (attribuibile al trattamento con corticosteroidi nel 40% dei casi). Tra i sintomi funzionali, i più frequenti sono stati: difficoltà respiratorie, pallore delle mucose ed edemi da stasi.

Le alterazioni ematologiche più frequentemente riscontrate sono state la presenza di leucogramma infiammatorio cronico (52.6%) e anemia (48.3%; per la maggior parte leggera, normocitica–normocromica e non rigenerativa), a conferma di quanto riportato. La trombocitopenia (considerando sia i soggetti con stima piastrinica ridotta che quelli con stima inadeguata) è stata riscontrata nel 26% dei casi, ovvero in percentuali inferiori rispetto a quanto riportato (50%) [48]. La leucopenia è stata ritrovata solo nel 7.5% dei casi a conferma di quanto riportato in letteratura (leucopenia poco frequente) [37, 47]. Anche la linfocitosi si è ritrovata in percentuali molto basse (6.7%), inferiori rispetto a quanto riportato (20%) [37, 47]; nella maggior parte dei casi era dovuta alla presenza di elevate quantità di blasti in circolo. Per quanto riguarda i linfomi al V stadio, l'esame dello striscio periferico ha evidenziato un 27.5% di forme leucemiche, mentre l'esame dell'agospirato midollare ne ha evidenziate un 49.5%: questi dati confermano la maggior capacità dell'aspirato midollare nello svelare le forme subleucemiche [63]. L'esame del midollo ha svelato inoltre che nei soggetti interessati da ipoplasia della serie eritroide, gli stadi interessati da riduzione erano soprattutto quelli proliferativi, rispetto ai maturativi: questo dato conferma il carattere non rigenerativo della maggior parte delle anemie riscontrate.

In letteratura è riportato che i cani con linfoma possono sviluppare segni di insufficienza d'organo secondaria all'infiltrazione neoplastica: in questo studio la funzionalità epatica è risultata alterata nel 16.7% dei casi, mentre la funzionalità renale nel 5.8% dei casi.

Tra i sintomi della sindrome paraneoplastica, l'unico riscontrato in questo studio è stato l'ipercalcemia, in percentuali molto basse (7.4%): tra questi, metà dei soggetti erano *probabili* fenotipi T (tra cui anche un mediastinico), mentre l'altra metà dei casi era colpita da linfomi di tipo B.

L'elettroforesi delle proteine sieriche ha confermato la presenza di infiammazione cronica nella maggior parte dei soggetti (53.8%).

Per quanto riguarda l'analisi di sopravvivenza, occorre tener conto del fatto che non tutti i soggetti sono stati sottoposti allo stesso protocollo terapeutico, comunque per la maggior parte il protocollo scelto è stato il COP (81.3%: 13/16). Dall'analisi è emerso quanto segue: il tasso di risposta completa ottenuto è del 68.7%, mentre il periodo di sopravvivenza mediano riscontrato è di 27 settimane (190 giorni): in linea di massima questi dati confermano quanto riportato in letteratura per il protocollo COP (tasso di risposta completa: 70%; sopravvivenza mediana: 130 giorni) [27], anche se la sopravvivenza mediana riportata in questo studio è leggermente superiore. La durata mediana della prima remissione è di 10 settimane (70 giorni), ed è superiore rispetto a quanto riportato in soggetti trattati con protocollo COP (45 giorni) [32]. Nei soggetti in cui si è ottenuta una seconda remissione, questa ha avuto durata mediana (4 settimane) inferiore rispetto alla prima (15.5 settimane), confermando quanto riportato in letteratura, ovvero che le remissioni successive sono in genere più brevi della prima.

Per quanto riguarda i fattori prognostici, si è visto che nessuno dei fattori analizzati è risultato statisticamente associato al tasso di remissione completa, a differenza di quanto riportato in uno studio di Teske *et al.* del 1994, condotto su 138 cani, in cui gli autori avevano trovato che lo stadio clinico e

il grado di malignità erano associati significativamente al tasso di remissione completa, che risultava più alto nei cani con la malattia al IV stadio e nei cani con linfoma ad alto grado di malignità (secondo la classificazione di Kiel) [68].

La presenza di uno stato infiammatorio cronico è risultato significativamente associato al tempo di comparsa della ricaduta (la ricaduta si è presentata molto prima nei soggetti con infiammazione cronica) e al tempo di sopravvivenza (la durata della sopravvivenza è stata inferiore nei soggetti con infiammazione cronica), confermando quanto riportato in uno studio di Baskin, Couto e Wittum del 2000, condotto su 145 cani, secondo cui nei soggetti che presentano infiammazione cronica è maggiore il rischio di presentare la ricaduta in tempi più brevi rispetto agli altri [2]¹. In questo stesso studio non era stata riscontrata, a discapito delle aspettative degli autori, un'influenza del pretrattamento con cortisone come singolo agente sulla ricaduta o sulla sopravvivenza, mentre in uno studio di Price del 1991 [60] la durata della remissione era risultata significativamente inferiore nei cani con linfoma pretrattati con glucocorticoidi rispetto a quelli non pretrattati con tali sostanze²: anche nel nostro studio la remissione ha avuto durata inferiore nei soggetti pretrattati, ma la differenza non è risultata significativa, mentre questo fattore è risultato significativamente associato al tempo di sopravvivenza, inferiore nei soggetti pretrattati.

Secondo alcuni studi le femmine hanno tempi di sopravvivenza superiori rispetto ai maschi [44], mentre altri non hanno evidenziato un'associazione tra il sesso e la prognosi [9, 46, 33, 31]: nel nostro studio la sopravvivenza mediana è stata minore nei maschi rispetto alle femmine, tuttavia la diffe-

¹Secondo gli autori di questo studio la spiegazione di questo fatto è la seguente: a seguito della stimolazione cronica del sistema immunitario, l'ospite esaurisce in qualche modo la capacità di produrre linfociti sani o di correggere le mutazioni durante la blastogenesi; inoltre un indebolimento della risposta immunitaria può condurre ad un incremento della resistenza ai chemioterapici e giocare quindi un ruolo nella comparsa della ricaduta.

²L'ipotesi comune è che i glucocorticoidi agiscano mediante un meccanismo di up-regulation sull'espressione della glicoproteina-P nelle cellule tumorali canine.

renza non è risultata significativa. La sopravvivenza mediana nei soggetti con malattia allo stadio II o III è risultata superiore rispetto ai soggetti con malattia allo stadio IV o V, come riportato in letteratura [68]; i tempi di sopravvivenza mediani inoltre sono risultati ridotti nei soggetti con substadio “b” rispetto a quelli con substadio “a”, tuttavia per entrambi i fattori la differenza non è risultata significativa. Considerando infine il fenotipo, si osserva come la sopravvivenza mediana dei soggetti con fenotipo T è superiore rispetto a quella dei soggetti con fenotipo B: anche se tale differenza non è risultata significativa, questo dato va comunque in controtendenza rispetto a quanto normalmente riporta la letteratura in merito, secondo cui la prognosi peggiore è associata al fenotipo T [68]. Occorre comunque considerare che in quest’analisi i linfomi T sono soltanto due, troppo pochi per un reale confronto da questo punto di vista.

Capitolo 5

CONCLUSIONI

I dati emersi da questo studio confermano per la gran parte quanto riportato in letteratura sulla malattia, sia per quanto riguarda i dati clinici, che i riscontri laboratoristici. Le differenze evidenziate con quanto riportato riguardo ai fattori prognostici sono attribuibili molto probabilmente al ridotto numero di soggetti a disposizione in questo studio per l'analisi di sopravvivenza. Ad ogni modo sono confermati i ruoli di fattori prognostici negativi dell'infiammazione cronica e del pretrattamento con corticosteroidi per il tempo di ricaduta e di sopravvivenza.

La presenza di infiammazione cronica, come visto, è situazione assai comune nei soggetti con linfoma ed è ipotizzabile una correlazione tra questa ed il ritardo nella diagnosi riscontrato nella maggior parte dei soggetti inclusi in questo studio. Il ricorso alla terapia con corticosteroidi prima ancora di aver accertato la diagnosi di linfoma (ma in alcuni casi anche nonostante il sospetto o la conferma della malattia stessa!) in quasi la metà dei soggetti analizzati in questo studio, mostra quanto sia diffusa tale pratica tra i clinici e rappresenta un importante campanello d'allarme.

Da queste considerazioni deriva l'importanza di un precoce riconoscimento della malattia e di una corretta conoscenza della gestione terapeutica della stessa.

Bibliografia

- [1] Abramo F, Galofaro V, Papini C, Arispici M, Poli A. *Classificazione istologica e immunoistochimica dei linfomi del cane*. In «*Argomenti di patologia veterinaria*», Fond. Iniz. Zooprof. e Zootecn., Brescia, 1994, 185-200.
- [2] Baskin CR, Couto CG, Wittum TE. *Factors influencing first remission and survival in 145 dogs with lymphoma: a retrospective study*. J. Am. An. Hosp. Assoc., 2000, 36: 404-409.
- [3] Blackwood L, et al. *Radiographic abnormalities in canine multicentric lymphoma: a review of 84 cases*. J. Small Anim. Pract., 1997, 38: 62.
- [4] Bowels CA, Bull M, McCornick K, et al. *Autologus bone marrow transplantation following chemotherapy and irradiation in dogs with spontaneous lymphomas*. J. Nat. Cancer Inst., 1980, 65: 615-620.
- [5] Brick JO, Roenigk WJ, Wilson GP. *Chemiotherapy of malignant lymphoma in dogs and cats*. J. Am. Vet. Med. Assoc., 1968, 153: 47-52.
- [6] Brooks MB, Matus RE, Leifer CE, Patnick AK. *Use of splenectomy in the management of lymphoma in dogs: 16 cases (1976-1985)*. J. Am. Vet. Med. Assoc., 1987, 191: 1008-1010.
- [7] Caniatti M, Roccabianca P, Scanziani E, Paltrinieri S, et al. *Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy*. Vet. Pathol., 1996, 33: 204-212.

-
- [8] Capurro C, Buracco P, Rossi L. *Il linfoma nel cane: aspetti clinici ed opzioni terapeutiche*. Veterinaria, Anno 4, 1990, 4: 15-29.
- [9] Carter RF, Harris CK, Withrow SJ, et al. *Chemotherapy of canine lymphoma with histopathological correlation: doxorubicin alone compared to COP as first treatment regimen* J. Am. Anim. Hosp Assoc., 1987, 23: 587-596.
- [10] Carter RF, Valli VEO, Lumsden JH. *The cytology, histology and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according the National Cancer Institute Working Formulation*. Can. J. Vet. Res., 1986, 50: 154-164.
- [11] Cello RM. *Ocular changes in malignant lymphoma of dogs*. Cornell Vet., 1962, 52: 492.
- [12] Chapman A, Bopp WJ, Brightwell AS, Cohen H, et al. *Preliminary report on virus-like particles in canine leukemia and derived cell cultures*. Cancer Res., 1976, 27: 18-25.
- [13] Coppoc GL. *Chemioterapia delle malattie neoplastiche*. In «Farmacologia e terapeutica veterinaria» di Adams HR, II ed, EMSI, Roma, 1999: 1143-1165.
- [14] Couto CG. *Utilizzo pratico della chemioterapia*. In «Medicina interna del cane e del gatto» di Nelson RW e Couto CG, III ed, Elsevier eds, Milano, 2006: 1131-1135.
- [15] Couto CG. *Canine extranodal lymphomas*. In «Current Veterinary Therapy IX. Small Animal Practice». RW Kirk ed, WB Saunders Co, Philadelphia, 1986: 473-477.
- [16] Couto CG, Cullen J, Pedroia V, et al. *Central nervous system lymphosarcoma in the dog*. J. Am. Vet. Med. Assoc., 1984, 184: 809-813.

-
- [17] Couto CG, Rutgers HG, Scherding RG, Rojko. *Gastrointestinal lymphoma in 20 dogs: a retrospective study*. J. Vet. Intern. Med., 1989, 3 (2): 73-78.
- [18] Cowell RL, Dorsey KE, Meinkoth JH. *Lymph node cytology*. Vet. Clin. Small Anim., 2003, 33: 47-67.
- [19] Deeg HJ, Appelbau FR, Weiden PL, et al. *Autologous marrow transplantation as consolidation therapy for canine lymphoma: efficacy and toxicity of various regimens of total body irradiation*. Am. J. Vet. Res., 1985, 46: 2016-2018.
- [20] Dhaliwal RS, Kitchell BE, Messick JB. *Il linfossarcoma nel cane: caratteristiche cliniche*. Veterinaria, anno 18, 2004, suppl 2: 39-47.
- [21] Dhaliwal RS, Reed AL, Kitchell BE. *Multicentric lymphosarcoma in a dog with multiple-site skeletal involvement*. Vet. Radiol. Ultrasound, 2001, 42: 38-41.
- [22] Dorn CR, Heuschele WP. *Humoral and cell-mediated immune competence of high cancer-risk-canine breeds*. Am. J. Vet. Res., 1978, 39: 1932-1935.
- [23] Dorn CR, Taylor DON, Frye FL, Schneider R et al. *Survey of animal neoplasms in Alameda Contra Costa counties, California. Methodology and description of cases*. J. Natl. Can. Inst., 1968, 40: 295-305.
- [24] Dorn CR, Taylor DON, Schneider R. *The epidemiology of canine leukemia and lymphoma*. Bibl. Hemat., 1970, 36: 403-415.
- [25] Fournel-Fleury C, Magnol JP, Bricaire P, Marchal T, et al. *Citohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodkin's lymphomas*. J. Comp. Path., 1997, 117: 35-39.

-
- [26] Fournel-Fleury C, Magnol JP, Guelfi JF. *The lymph node*. In «*Color atlas of cancer cytology of the dog and cat*». Fournel-Fleury C, Magnol JP, Guelfi J. ed Conf. Nat. Vet. Spec. Pet. Anim., Paris, 1994: 245-52.
- [27] Frimberger AE. *New protocols for canine lymphoma*. Tufts Animal Expo, North Grafton, MA, USA, 2002.
- [28] Gavazza A. *Il linfoma nel cane come possibile indicatore di inquinamento ambientale*. Tesi di dottorato in Medicina Veterinaria, Pisa, 1998.
- [29] Gavazza A, Presciuttini S, Barale R, et al. *Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas and use of chemicals by dog owners*. J. Vet. Intern. Med., 2001, 15: 190-195.
- [30] Ghernati I, Auger C, ChabanneL, Corbin A. *Characterization of canine long term T cell line (DLC 01) established from a dog with Sézary Syndrome and producing retroviral particles*. Leukemia, 1999, 13: 1281-1290.
- [31] Greenlee PG, Filippa DA, Quimby FW, Patnaik AK, Calvano SE, Matus RE, Kimmel M, Hurvitz AI. *Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic and clinical study*. Cancer, 1990, 66: 480-490.
- [32] Hahn KA. *Lymphoma: good COP, bad COP*. ACVIM (Oncology), Houston, TX, 2002.
- [33] Hahn KA, Richardson RC, Teclaw RF, et al. *Is maintenance chemotherapy appropriate for the management of canine malignant lymphoma?* J. Vet. Int. Med., 1992, 6: 3-10.
- [34] Hardy WD, Old LJ. *L-asparaginase in the treatment of neoplastic diseases of the dog, cat and cow. Recent results*. Cancer Res., 1970, 33: 131-139.

-
- [35] Harkin KR, Kennedy GA, Moore WE, Schoning P. *Skeletal muscle lymphoma in a bullmastiff*. JAAHA, 2000, 36: 63-66.
- [36] Hayes HM, Tarone RE, Cantor KP, et al. *Case-control study of canine malignant lymphoma: positive association with dog-owner's use of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicides*. J. Natl. Cancer. Inst., 1991, 83: 1226-1231.
- [37] Jain NC. *The leukemias*. In «*Schalm's Veterinary Hematology*», V ed, Lea&Febiger eds, Philadelphia, 1993: 333-335.
- [38] Jeglum KA, Young KM, Barnsley K, Whereat A. *Chemotherapy versus chemotherapy with intralymphatic tumor cell vaccine in canine lymphoma*. Cancer, 1988, 61: 2042-2050.
- [39] Kaldrymidou E, Papaioannou N, Pouthahidis T, et al. *Malignant lymphoma in nasal cavity and paranasal sinuses of a dog*. J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med., 2000, 47: 457-462.
- [40] Keller ET. *Immune-mediated disease as a risk factor for canine lymphoma*. Cancer, 1992, 7: 2334-2337.
- [41] Laing EJ, Fitzpatrick PJ, Binnington AG, et al. *Half-body radiotherapy in the treatment of canine lymphoma*. J. Vet. Intern. Med., 1989, 3: 102-108.
- [42] Lennert K, Stein H, Kaiserling E. *Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphoma*. Br. J. Cancer., 1975, 31 suppl. 2: 29-43.
- [43] Lukes RJ, Collins RD. *Immunologic characterization of human malignant lymphomas*. Cancer, 1974, 34: 1488-1503.

-
- [44] MacEwen EG, Hayes AA, Matus RE, Kurzman I. *Evaluation of some prognostic factors for advanced multicentric lymphosarcoma in the dog - 147 cases (1978-1981)*. J. Am. Vet. Med. Assoc., 1987, 190: 564-568.
- [45] MacEwen EG, Hayes AA, Mooney S, et al. *Levamisole as adjuvant to chemotherapy for canine lymphosarcoma*. J. Biol. Response Mod., 1985, 4: 427-433.
- [46] MacEwen EG, Rosental RC, Fox LE, Loar AS, et al. *Evaluation of L-asparaginase: polyethylene glycol conjugate versus native L-asparaginase combined with chemotherapy. A randomized double-blind study in canine lymphoma*. J. Vet. Intern. Med., 1992, 6: 230-234.
- [47] Madewell BR. *Hematological and bone marrow cytological abnormalities in 75 dogs with malignant lymphoma*. J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 1986, 22: 235.
- [48] Madewell BR, Feldman BF, O'Neil S. *Coagulation abnormalities in dogs with neoplastic disease*. Thromb. Haemost., 1980, 44: 35-38.
- [49] Madewell BR, Theilen GH. *Hematopoietic neoplasms, sarcomas and related conditions. part IV: Canine*. In «*Veterinary Cancer Medicine*», Theilen GH, and Madewell BR (eds), II ed. Lea and Febiger, Philadelphia, 1987: 392-407.
- [50] Maiolino P, De Vico G. *Primary epitheliotropic T-cell lymphoma of the urinary bladder in a dog*. Vet. Pathol., 2000, 37: 184-186.
- [51] Manuten DJ, Cociba GJ, Capen CC, et al. *Hypercalcemia in dogs with lymphosarcoma. Biochemical, ultrastructural, and istomorphometric investigations*. Lab. Invest., 1983, 49: 553-562.
- [52] Mealey KL. *Do glucocorticoids induce multidrug resistance?*. ACVIM 2003.

-
- [53] Michels GM, Knapp DW, David M, et al. *Penile prolapse and urethral obstruction secondary to lymphosarcoma of the penis in a dog*. JAAHA, 2001, 37: 474-477.
- [54] Morris JS, Dunn JK, Dobson JM. *Canine lymphoid leukaemia and lymphoma with bone marrow involvement: a review of 24 cases*. J. Small Animal Pract., 1993, 34: 72-79.
- [55] Muller GH, Kirk RW, Scott DW. *Cutaneous lymphosarcoma*. In «*Muller and Kirk's Small Animal Dermatology*», V ed, WB Saunders Co, Philadelphia, 1995: 1064-1072.
- [56] National Cancer Institute. *Sponsored study of classification of non-Hodkin's lymphomas*. Cancer, 1982, 49: 2112-2135.
- [57] Nelson RW, Couto CG. *Il linfoma nel gatto e nel cane*. In «*Medicina interna del cane e del gatto*», III ed, Elsevier eds, Milano, 2006: 1150-1160.
- [58] Ogilvie GK. *Chemiotherapy: newest advances for the New Millennium*. Atti del 42° Congresso Nazionale SCIVAC, Milano, 1 Aprile 2001: 317-327.
- [59] Postorino NC, Susaneck NJ, Withrow SJ, et al. *Single agent therapy with Adriamycin for canine lymphosarcoma*. J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 1989, 25: 221-225.
- [60] Price G, Page R, Fisher B, et al. *Efficacy and toxicity of doxorubicin/cyclophosphamide maintenance therapy in dogs with multicentric lymphosarcoma*. J. Vet. Int. Med., 1991, 5: 259-262.
- [61] Priester WA, MacKay FW. *The occurrence of tumors in domestic animals*. Natl. Cancer. Inst. Monogr., 1980, 54: 166.

-
- [62] Rappaport H. *Tumors of the hematopoietic system*. In *«Atlas of Tumor Pathology»*, Armed Forces Institute of Pathology, 1966, 3: 8-15.
- [63] Raskin RE, Krehbiel JD. *Prevalence of leukemic blood and bone marrow in dogs with multicentric lymphoma*. J. Am. Vet. Med. Assoc., 1989, 194: 1427-1429.
- [64] Reif JS, Lower KS, Olgivie CK. *Residential exposure to magnetic fields and risk of canine lymphoma*. Am. J. Epidemiol., 1995, 141: 352-359.
- [65] Rosenberg MP, et al. *Prognostic factors in dogs with lymphoma and associated hypercalcemia*. J. Vet. Intern. Med., 1991, 5: 268.
- [66] Schwartz SN. *Spontaneous regression of lymphosarcoma in a dog*. J. Am. Vet. Med. Assoc., 1988, 198: 222-224.
- [67] Teske E, Devos JP, Egberink HF, et al. *Clustering in canine malignant lymphoma*. Vet. Quarterly, 1994, 16: 134-136.
- [68] Teske E, Heerde P, Rutteman GR, Kurzman I, et al. *Prognostic factors in canine non-Hodgkin's lymphomas. A prospective study in 138 dogs*. J. An. Vet. Med. Ass., 1994, 205: 1722-1728.
- [69] Teske E, Rutteman GR, Heerde P, Misdorp W. *Polyethylene glycol-L-asparaginase in canine non-Hodgkin's lymphoma*. Eur. J. Cancer, 1990, 26: 891-895.
- [70] Teske E, Rutteman GR, Kuipers-Dijkshoorn NJ, al. *DNA ploidy and cell kinetics characteristics in canine non-Hodkin's lymphoma*. Exp. Hematol., 1993, 21: 579-584.
- [71] Teske E, Wisman P, Moore PF, VanHeerde P. *Histologic classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas: unexpected high frequency of T cell lymphomas with B cell morphology*. Exper. Hematol., 1994, 22: 1179-1187.

- [72] Tomley FM, Armstrong SJ, Mahy BW, Owen LN. *Reverse transcriptase activity and particles of retroviral density in cultured canine lymphosarcoma supernatants*. Br. J. Cancer, 1983, 47: 277-284.
- [73] Turinelli V. *Il linfoma nel cane: classificazione citomorfologica e riscontro immunofenotipico*. Tesi di laurea in Medicina Veterinaria, Pisa, 2000.
- [74] Turinelli V. *Esplorazione del tessuto linfoide nella specie canina. Applicazione allo studio di alcuni sottotipi di Linfomi maligni Non Hodgkin del cane, ancora poco conosciuti, in comparazione con i dati umani*. Tesi di dottorato in Medicina Veterinaria, Pisa, 2003.
- [75] Vail DM, MacEwen EG, Young KM. *Canine lymphoma and lymphoid leukemias*. In Withrow SJ, MacEwen EG (eds) *Small Animal Clinical Oncology*, III ed, WB Saunders, Philadelphia, 2001: 558-590.
- [76] Vicini DS, Oglivie GK, Katzenellenbogen, et al. *Measurement of estrogen receptors in normal and neoplastic lymph node tissue from dogs*. Am. J. Vet. Res., 1991, 52: 2055-2059.
- [77] Weiden PL, Storb R, Kolb HJ, et al. *Immune reactivity in dogs with spontaneous malignancy*. J. Natl. Cancer. Inst., 1974, 53: 1049-1056.
- [78] Weir EC, Nordin RW, Matus RE, et al. *Humoral hypercalcemia of malignancy in canine lymphosarcoma*. Endocrinology, 1988, 122: 602.
- [79] Weller RE, Holmberg CA, Theilen GH, Madewell BR. *Histologic classification as a prognostic criterion for canine lymphosarcoma*. Am. J. Vet. Res. 1980, 41: 1310-1314.
- [80] Weller RE, Theilen GH, Madewell BR, et al. *Chemioimmunotherapy for canine lymphosarcoma: a prospective evaluation of specific and non-specific immunomodulation*. Am. J. Vet. Res., 1980, 41: 516-521.

- [81] White SD, Rosychuk RAW, Scott KW, et al. *Use of isoretinoin and etretinate for the treatment of bening cutaneous lymphoma in dogs*. J. Am. Vet. Med. Assoc., 1993, 202: 387-391.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio innanzitutto il professor Lubas per avermi permesso di lavorare a questa tesi in piena libertà di tempi e modi d'esecuzione, per tutta la disponibilità dimostratami nel lavoro di raccolta dati e di stesura finale, nonchè per tutto quello che ho potuto imparare da lui in questi ultimi due anni di università. Ringrazio la dottoressa Gavazza per l'aiuto fornitomi, per i preziosi consigli e suggerimenti e per il sostegno datomi nei momenti di dubbio o di incertezza. Ringrazio inoltre la dottoressa Gugliucci, anche lei per l'aiuto fornitomi e per la cordialità che ha sempre dimostrato nei miei confronti e il dottor Delgadillo per l'allegria e per le risate che mi ha sempre fatto fare nei momenti trascorsi in laboratorio.

Il ringraziamento più grande va ai miei genitori per avermi sempre sostenuto nelle scelte, per aver creduto sempre in me e per avermi dato l'opportunità di studiare lontano da casa e coronare così il mio sogno... spero di non deludervi mai!

Ringrazio inoltre tutta la mia grande famiglia (nonni, nonne, zie, zii, cugini grandi e piccoli) per il sostegno che mi ha sempre dato in questi anni di studio e in particolare le mie zie Anna e Paola (per lei il *secondo fine* era piuttosto esplicito!), soprattutto per la comprensione dimostrata nei confronti delle mie assenze da casa, anche nel lungo periodo della malattia di nonno; ringrazio i miei cugini Marco e Alessandra per tutto quello che hanno fatto per lui e per tutto quello che continuano a fare per nonna.

Ringrazio le mie splendide amiche di Roma, Valentina e Susanna, per

aver pazientemente sopportato i miei continui “Mi dispiace, devo studiare...” o “Non posso, sono a Pisa...”: sapere di avervi sempre accanto è stato un grande punto di forza per me!

Ringrazio il mio amico Emiliano, che nel superare quella dura prova cui la vita l’ha sottoposto, ha saputo dimostrarmi tutto l’affetto e tutta la fiducia che ripone in me! Grazie!

Ringrazio la mia coinquilina Barbara, con il suo arrivo, tre anni fa, in casa si è finalmente respirata aria di libertà e tranquillità! Per rimanere in tema, ringrazio anche Genny, per l’affetto e per la solidarietà dimostratami in quel primo anno di difficile convivenza!

Per tutte le risate fatte, le feste, le cene, le crêpes alla Nutella, le uscite e le serate trascorse insieme e il sostegno reciproco, ringrazio tutto quel variegato manipolo di amici che ha contribuito a rendere questi anni di studio più allegri e spensierati: Ele, Marcy, Vane&Vale (indissolubili come sempre), Ire, Ila, Julia, Faby, Nick, Gae&Agnese, Ziad&Elena, Fede&Vera, ma anche Andrea, Francesca, Alice, Elisa, Ilaria... e tutti quelli che mi sto dimenticando di nominare ma con i quali ho condiviso qualcosa in questi anni! Non per essere malinconica, ma so già che mi mancherete tutti un casino!

Infine, per ultima, ma assolutamente al primo posto nel mio cuore, ringrazio quella persona che per uno strano scherzo il destino ha voluto mettere al mio fianco proprio nel momento d’inizio di questo percorso e alla quale devo tutto il merito della serenità con cui ho affrontato questi anni di università: grazie per tutto l’amore e la forza che mi hai dato, grazie per tutto ciò che hai saputo insegnarmi, grazie per essermi stato sempre vicino, anche quando i km ci dividevano, grazie per tutto il rispetto che hai sempre dimostrato e per tutta la pazienza che hai avuto, grazie per essere ancora qui, oggi, a sostenermi e aiutarmi nelle grandi scelte. Grazie, Andrea.